

細菌運動の力学に関する研究

著者	曲山 幸生
学位授与機関	Tohoku University
URL	http://hdl.handle.net/10097/55145

細菌運動の力学に関する研究

曲山幸生

①

細菌運動の力学に関する研究

曲山幸生

1996年

目 次

1 はじめに.....	1
1.1 研究の背景と目的.....	1
1.2 本論文の構成.....	4
2 細菌の運動とその力学的環境.....	5
2.1 細菌の運動.....	5
2.1.1 細菌の形態と移動方法.....	5
2.1.2 細菌の走性.....	6
2.1.3 細菌運動の源「べん毛モーター」.....	9
2.2 低レイノルズ数の世界.....	11
2.2.1 レイノルズ数.....	12
2.2.2 細菌運動の時定数.....	14
2.3 ブラウン運動の世界.....	17
2.4 まとめ.....	19
2.5 補足.....	20
3 レーザー暗視野顕微鏡の開発.....	21
3.1 背景と目的.....	21
3.2 材料と方法.....	23
3.3 結果.....	24
3.3.1 レーザー暗視野顕微鏡の仕様と構成.....	24
3.3.2 測定結果.....	29
3.4 考察.....	37
3.4.1 べん毛モーターのトルク発生機構.....	37
3.4.2 レーザー暗視野顕微鏡の応用.....	38
3.5 まとめ.....	38
4 単べん毛細菌の運動解析.....	39
4.1 背景と目的.....	39
4.1.1 微小世界の流体力学.....	39
4.1.2 べん毛モーターの特性解析.....	40
4.2 材料と方法.....	42
4.2.1 <i>Vibrio</i> の特徴.....	42
4.2.2 スムーズ突然変異体 YM42.....	43
4.2.3 試料調製.....	44
4.2.4 べん毛回転数と遊泳速度の測定.....	45
4.2.5 菌体とべん毛の形状の測定.....	45
4.3 結果.....	46
4.3.1 遊泳速度とべん毛回転数の同時測定.....	46
4.3.2 遊泳速度とべん毛回転数の関係.....	49
4.3.3 採用したモデルと形態のパラメーター.....	51
4.3.4 遊泳速度とべん毛回転数の比.....	55
4.3.5 べん毛モーターのトルク.....	56
4.3.6 べん毛回転数と遊泳速度の計算結果.....	59

4.4 考察.....	61
4.4.1 高速回転の意味.....	61
4.4.2 実験結果と計算結果の定量的な差.....	62
4.4.3 べん毛モーターのトルク特性.....	63
4.4.4 形態のパラメーターの最適値.....	66
4.5 まとめ.....	68
5 周べん毛細菌の運動解析.....	69
5.1 背景と目的.....	69
5.2 材料と方法.....	71
5.3 結果.....	71
5.3.1 べん毛束の回転数と遊泳速度の関係.....	71
5.3.2 v/f 値の解析.....	74
5.4 考察.....	76
5.4.1 高粘性下での実験.....	76
5.4.2 束の中のべん毛.....	77
5.4.3 粘性と細菌の運動様式.....	80
5.5 まとめ.....	81
5.6 補足.....	82
6 べん毛モーターのスイッチ.....	84
6.1 背景と目的.....	84
6.1.1 走化性システムの構成要素.....	85
6.1.2 走化性におけるべん毛モーター.....	89
6.2 材料と方法.....	90
6.2.1 培地、溶液.....	90
6.2.2 細菌株.....	90
6.3 結果.....	91
6.3.1 復帰突然変異体の分離.....	91
6.3.2 <i>cheY</i> サプレッサー変異の別の遺伝的背景への遺伝子導入.....	97
6.3.3 遊泳パターンの分類.....	99
6.3.4 遊泳パターンと変異部位.....	101
6.3.5 対立遺伝子特異性.....	104
6.4 考察.....	106
6.4.1 スイッチ突然変異のふたつのグループ.....	106
6.4.2 回転方向を変化させるふたつの部位.....	107
6.5 まとめ.....	108
7 おわりに.....	109
7.1 第6章までのまとめ.....	109
7.2 マイクロ理工学への展開.....	110
7.2.1 小さいことの有利さ.....	110
7.2.2 大きいことの有利さ.....	112
7.2.3 その間を結ぶ技術.....	112
7.3 まとめ.....	114
謝辞.....	116

引用文献	117
第1章の引用文献	117
第2章の引用文献	117
第3章の引用文献	118
第4章の引用文献	119
第5章の引用文献	121
第6章の引用文献	122
第7章の引用文献	123
発表リスト	124
主論文	124
参考論文	124
解説	125
国際会議発表	126
国内学会発表	127

—— 図表一覧 ——

図1 生物の大きさとレイノルズ数の関係。	2
図2 細菌のべん毛型。	8
図3 細菌のランダムウォーク。	9
図4 べん毛モーター・べん毛の模式図。	11
図5 流体中の物体の運動。	15
図6 テザードセルとスタックセルの概念図。	22
図7 細菌のレーザー暗視野顕微鏡像。	25
図8 べん毛とスリットの位置を合わせるための光学系の模式図。	26
図9 レーザー暗視野顕微鏡の構成。	27
図10 レーザー暗視野顕微鏡のノイズの大きさ。	29
図11 SJW3076 のレーザー暗視野顕微鏡のデータ。	30
図12 SJW3076 のべん毛回転数のデータ。	31
図13 SJW3076 のべん毛回転数の急激な変化。	33
図14 スイッチ突然変異体のべん毛回転。	36
図15 $Sw_{30}(\Delta Che)$ のレーザー暗視野顕微鏡データ。	37
図16 代表的な人工の電磁式モーターのトルク-回転数特性。	41
図17 テザードセルとスタックセル。	42
図18 <i>V. alginolyticus</i> の運動。	43
図19 <i>V. alginolyticus</i> YM42 の電子顕微鏡像。	44
図20 遊泳する細菌のべん毛回転数を測定する方法。	47
図21 <i>V. alginolyticus</i> YM42 のレーザー暗視野顕微鏡データの例。	48
図22 <i>V. alginolyticus</i> YM42 のべん毛回転数と遊泳速度の関係。	50
図23 細菌の運動を解析するために採用したモデルの模式図。	53
図24 菌体とべん毛の形状を表すパラメーター。	54
図25 <i>V. alginolyticus</i> YM42 の菌体の長さとべん毛の長さの間の相関。	55
図26 べん毛回転数と遊泳速度の計算結果。	60

図 27	べん毛繊維の長さとべん毛回転数、遊泳速度の関係。	65
図 28	形態のパラメーターと効率、遊泳速度の関係。	67
図 29	<i>S. typhimurium</i> SJW3076 の電子顕微鏡写真。	70
図 30	<i>S. typhimurium</i> SJW3076 の LDM データの例。	73
図 31	<i>S. typhimurium</i> SJW3076 のべん毛束回転数と遊泳速度。	74
図 32	菌体当たりのべん毛本数に対する計算した v/f 値。	76
図 33	平行な 2 本の円柱間の距離とそれに働く抵抗力の関係。	79
図 34	複数のべん毛を持つ細菌の運動モデル (概念図)。	83
図 35	細菌の走化性システムの概念図。	88
図 36	<i>cheY</i> 突然変異体の系統。	93
図 37	復帰突然変異体の分離方法。	94
図 38	サプレッサー変異部位の詳細なマッピング。	96
図 39	親株によるサプレッサー変異部位のかたよりの違い。	97
図 40	<i>cheY</i> サプレッサー変異の別の遺伝的背景への遺伝子導入。	98
図 41	遊泳パターンの 5 段階の分類。	99
図 42	スイッチ突然変異体の遊泳パターン。	102
図 43	遊泳パターンに対する遺伝的背景の及ぼす影響。	102
図 44	遊泳パターンに関する Sw ($CheY^+$) と Sw (ΔChe) の間の関係。	103
図 45	スイッチ複合体の回転方向スイッチのメカニズム (モデル)。	108
図 46	筋肉の階層的構造。	115

表 1	力学的エネルギーを発生する代表的な生体分子機械。	10
表 2	水分子と細菌の運動の力学的なパラメーターの比較。	19
表 3	研究に使われた細菌株。	23
表 4	<i>S. typhimurium</i> の培地、溶液の組成。	24
表 5	レーザー暗視野顕微鏡の部品一覧。	28
表 6	スイッチ変異によるべん毛回転数変動の違い。	36
表 7	<i>Vibrio</i> の極べん毛と周べん毛の比較。	43
表 8	<i>V. alginolyticus</i> の液体培地と観察溶液の組成。	44
表 9	<i>V. alginolyticus</i> YM42 のべん毛回転数と遊泳速度。	49
表 10	v/f 値の実験値と計算値。	51
表 11	<i>V. alginolyticus</i> YM42 の菌体とべん毛の形態のパラメーター。	54
表 12	観察溶液の粘度。	58
表 13	べん毛モーターのトルクの見積もり。	58
表 14	<i>S. typhimurium</i> SJW3076 のべん毛束回転数と遊泳速度。	73
表 15	べん毛束回転数に対する遊泳速度の比 (v/f 値)。	73
表 16	<i>S. typhimurium</i> SJW3076 の形態のパラメーター。	75
表 17	<i>E. coli</i> と <i>S. typhimurium</i> の走化性システムの遺伝子。	86
表 18	培地、溶液の組成。	90
表 19	研究に使われた <i>S. typhimurium</i> の細菌株。	91
表 20	<i>cheY</i> 突然変異体のサプレッサー突然変異部位の大まかなマッピング。	92
表 21	スイッチ突然変異体の遊泳パターン (例)。	100
表 22	$Sw(CheY^+)$ の走化性応答 (例)。	105
表 23	スイッチ遺伝子と <i>cheY</i> 遺伝子の対立遺伝子特異性。	105
表 24	スイッチ突然変異のふたつのタイプ。	106

1 はじめに

1.1 研究の背景と目的

半導体製造技術を応用した微小機械（マイクロマシン）の製造・実用化が近年現実となってきた。微小世界で作業する機械が、それに見合った大きさを持っていることは自然の成り行きである。しかしながら、私たちが今までに蓄積してきた機械設計に関する知識は、私たちが日常接している世界にしか適用できない場合が多い。現状の機械をそのまま小さくしただけでは、効率が極端に悪くなったり、まったく動かないということが起こりうる。私たちはまだ、マイクロマシン固有の問題に対処すべき設計指針は十分に持ち合わせていない。

一方、生物の世界に目を転じてみると、そこは多様性ということばがびったりする。形、大きさ、色、やり方、すべての点でそれぞれの生物が好き勝手にデザインされているように見える。しかし、注意深く観察すると、そのデザインが採用された理由が存在する場合が多い。一見人間には理由が見いだせない場合でも、実は生物にとっては重要な意味が含まれているのかもしれない。ここでは、機械設計に関連すると思われる生物の運動に関して、その多様性を整理してみよう。

自然界にはさまざまな生物が生活しており、そのうちかなりの種類のものが自力で移動できる能力を持っている。私たちはすぐに、地上を足を使って歩いたり走ったりする方法を思い浮かべるが、その他に、水中を泳いだり、空中を飛んだりできる生物も数多い。なかには、水面を走るという忍者のような生物もいる。例えば、アメンボやある種のトカゲ（Glasheen and McMahon, 1996）などである。移動できる次元（平面か立体か）と移動手段の多様性という観点からみて、固体表面を移動するものよりも流体中を移動する生物のほうが、また大きな生物よりも小形の生物のほうが私には興味深い。

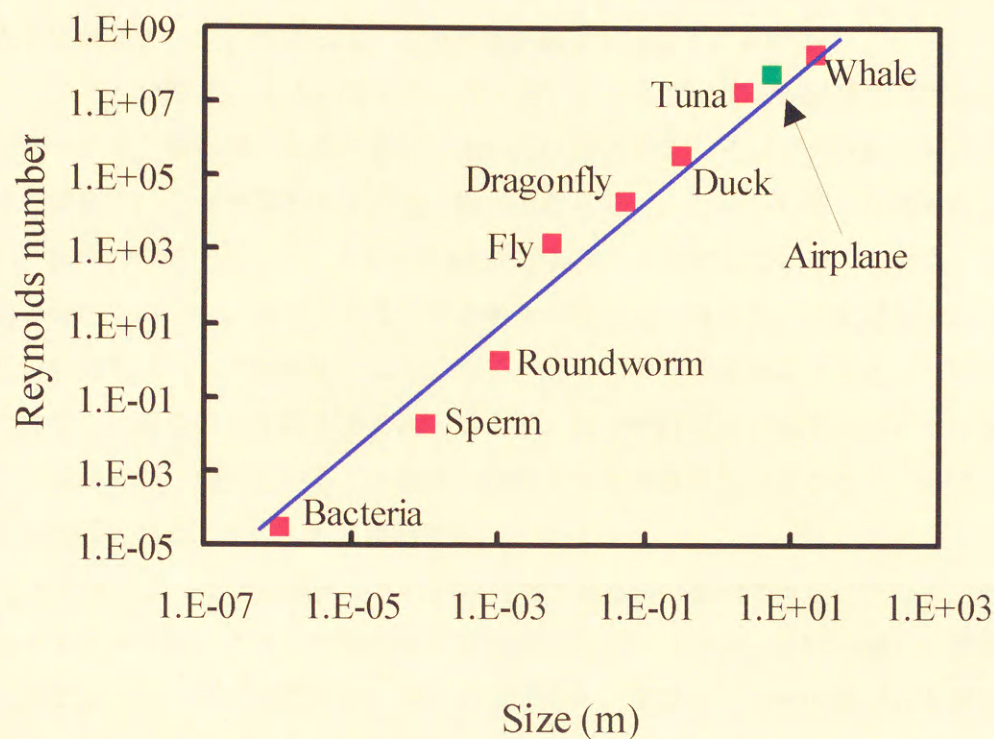


図1 生物の大きさとレイノルズ数の関係。

細菌、精子、線虫、ハエ、トンボ、アヒル、マグロ、鯨、飛行機の大きさとレイノルズ数の関係をプロットした。ほぼ青い直線の周辺に分布している。林(1988)、Azuma(1992)、大貫&河内(1995)、河内(1995)の文献を参考にした。

流体中を運動する生物の体の大きさとレイノルズ数¹の間には、意外なことに、明らかな関係がある（図1；林, 1988; Azuma, 1992; 河内, 1995; 大貫 and 河内, 1995）。つまり、生物の大きさのほぼ2乗とレイノルズ数は比例しているのである。この関係から言えることは、単位時間あたりに移動できる距離は生物の大きさとほぼ比例していて、その比例定数は生物全体であまり変化していないということである。つまり、拡大縮小をおこなえば、細菌²もマグロも似たような遊泳速度を持った運動に見えるということを示している。具体的に言えば、水中を泳ぐほとんどの生物は、1秒間に体長のおおよそ10倍の距離を移動できるのである。空気は水とは粘度も密度も異なるが、おもしろいこと

¹ レイノルズ数：流体を特徴づける無次元量。流体の粘度と密度を μ と ρ 、代表的な長さと速度を L と U とすると、レイノルズ数 $Re = \rho LU / \mu$ と表される。詳細は後述する。

² 細菌 (bacteria)：単細胞原核生物。形はさまざまだが、菌体の幅は $0.5\mu\text{m}$ から $5\mu\text{m}$ 程度である。

に、人間が作った飛行機までもこの関係を満たしている。流体中を運動する生物や機械は、上手に設計されているならば、この関係を満足するように見える。

しかし、大きさ（あるいはレイノルズ数）に応じて、その運動様式には変化がある。鯨やマグロ、飛行機、大形の鳥は、その体は流線形をしていて、ひれや翼はふくらみを持ち細長い。ひれや翼をあまり速く動かさなくとも、たいへん速く移動することができる。流体力学的に見ると、それらは揚力¹を利用して運動しているのである。同じように羽を持つものでも、昆虫となるとその動きはまったく異なる。常に羽をせわしなく動かし、体形もけっして流線形とは言えない。さらに小さな生物になると、もはや翼やひれではなく、線虫のように体をくねらせたり、精子や鞭毛虫、繊毛虫のように繊維の鞭打ちで運動をおこなっている。本論文で対象とする細菌はもっと小さく、らせん形のべん毛を回転させることによって移動する。

大きさによって運動様式がきれいに分類されるのは偶然ではないだろう。その大きさ（レイノルズ数）に合った運動様式を採用したものだけが、自然の厳しい審査を合格し、今日私たちの目の前に存在しているのである。実際に、昆虫の飛び方を研究すると、今まで人間が利用できなかった非定常状態の流体力学を、たいへん上手に使いこなしているようだということが最近になってわかってきた（大貫 and 河内, 1995; 河内, 1995）。それぞれの生物の運動様式、あるいは力学的特性はその大きさと密接な関係があり、違う大きさからの類推で判断するとたいへんな過ちを犯すことになることに注意しなければならない。

マイクロメーターの大きさを持つ細菌の運動は、微小世界に適した様式が採用されているに違いない。これを研究することによって、まだ私たちが気づいていない微小世界の力学的な特徴や、そこで働く機械の方式の意外性を明らかにしていけると考えられる。このような研究の成果がマイクロマシンの設計指針にも反映されるだろう。つまり、マイクロマシンの設計指針を獲得するひとつの方策として、小さな生物の運動機構の研究が有効だと考えられる。このアプローチから、微小世界で何億年も進化を重ねてきた生物（細菌）が身につけた豊かな知恵を、私たち人間も享受することができるようになるだろう。例えば、生体分子機械²の製造技術である自己集合（自己組織化）を応用したナノマシンまでも、その特長を生かしきって使いこなせる日が来るに違いない。本

¹ 揚力：流体中の物体に働く力のうち、流れに垂直方向の成分をいう。流れと同じ方向の成分は抗力である。

² 生体分子機械：酵素やべん毛モーターなど、生体中でひとまとまりの構造を持ち、決まった機能を果たす、生体高分子（タンパク質や糖、脂質など）でできた機械をさす。生体分子機械は、部品自身が組み立てに関する情報を持っていて、自己集合によって完成した機械に組み立てられる。

研究の目的は、このような背景に基づき、細菌の運動について力学的な側面から研究し、その特徴を整理することである。

1.2 本論文の構成

本論文は以下のように構成されている。

まず、第2章「細菌の運動とその力学的環境」を設けた。ここでは、細菌の運動に関する基礎的事項を整理した。さらに、細菌の運動との関連の深い微小世界の力学的特徴である、低レイノルズ数の流体力学とブラウン運動について、人間の世界と対比しながら整理する。

細菌の運動を実験的に解析するためには、べん毛の回転数を測定する技術は不可欠であったので、本研究でべん毛1本の自然の状態の回転を測定できる「レーザー暗視野顕微鏡」を開発した。第3章「べん毛1本の回転計測法の開発」では、その仕様とそれを用いて得られた新しい知見について述べる。

続くふたつの章は、レーザー暗視野顕微鏡を用いて細菌の世界の力学について実験的に検証した研究に関するものである。第4章「単べん毛細菌の運動解析」では、単純なシステムである単べん毛細菌を題材として、細菌の世界の力学の基本的な性質を検証する。続く第5章「周べん毛細菌の運動解析」では、べん毛束の力学的な性質が1本のべん毛とどのように違うのかを、周べん毛細菌を用いた実験に基づいて考察する。

第6章の「べん毛モーターの回転方向スイッチ」において、細菌の運動システムのアクチュエーターであるべん毛モーターの回転方向切り替えスイッチの性質を調べた。遺伝学的・行動学的に研究した結果から、人工の機械とは対照的な性質をべん毛モーターが持っていることを議論する。

最後（第7章）に、ふたたびマクロな世界とミクロな世界のそれぞれの特徴についてまとめ、それらを生かす技術、それらをつなぐ技術の重要性について述べる。

2 細菌の運動とその力学的環境

本論文で述べる研究は、細菌の運動を解析することによって、微小世界の力学上の特徴を明らかにしようという目的を持っている。その導入として、本章では、細菌がどのような運動様式を採用しているのかを述べたあと、細菌が生活している微小世界の一般的な力学上の特徴を、人間が生活しているマクロな世界と比較しながら整理する。

2.1 細菌の運動

2.1.1 細菌の形態と移動方法

自力で移動できる生物の中でもっとも小さな細菌だけを見ても、その移動方法(あるいは、それを決めるべん毛型¹⁾)は多様である(図 2; Krieg, 1984)。例えば、俵形の菌体の極(俵の絞ってある部分)から 1 本だけべん毛が生えているという、単純な運動システムを持つ細菌が存在する。*Pseudomonas* や、本研究で実験に使用した *Vibrio* がこのグループに含まれる。同じ 1 本のべん毛でも、菌体の側部から生えているもの(*Desulfuromonas acetoxidans*)もある。菌体の極からべん毛が生えている細菌の中には、1 本ではなく複数本まとめて生えているものもある(*Halobacterium* など)。それらの中には、一方の極からだけ生えるのものもあるし、両方の極から生えているものもある。細菌の運動の研究対象として、これまでもっとも数多く用いられてきたのは、*Escherichia coli* (大腸菌)や

¹ べん毛型：本論文ではべん毛の生え方という意味で使用する。べん毛の生える位置や本数のタイプである。

Salmonella typhimurium であるが、これらのべん毛の生える部位は決まっているわけではなく、ランダムであるようだ。べん毛の本数もはっきり決まっておらず、個体ごとのばらつきが大きい。*Spirillum* の菌体はらせん形をしている。べん毛だけでなく、菌体も推進力に寄与しているのかもしれない。特徴的なのはスピロヘータで、菌体の極からべん毛が束になって生えているのだが、べん毛束は細胞内膜と細胞外膜の間の空間に存在し、菌体の外側の空間にはない。ほかのタイプの細菌はべん毛を船外スクリューのようにして泳ぐのに対して、スピロヘータは自身のらせん形の菌体を回転させて移動する。

このように細菌が多様なべん毛型を進化させてきたからには、それなりの理由が存在するに違いない。細菌はおそらくべん毛を移動するためだけに使っているのも、その理由も移動する上での利点に関係しているだろう。その中には微小世界に固有のもの（特に、力学上の性質）も含まれているかもしれない。細菌の多様な移動方法を研究することは、決して細菌の問題だけにとどまらなないと考えられる。

2.1.2 細菌の走性¹

細菌の運動は決してランダムではなく、光や酸素、化学物質、pH、温度などの刺激に応答し、細菌にとってより好ましい環境へ集まる性質を持っている。この性質は走性と呼ばれている。ところが、よく研究されている *E. coli* や *S. typhimurium* の運動を顕微鏡で観察すると、スーッとなめらかに泳いでいるかと思うと、次の瞬間急にころげまわり（タンブリング）、次に新たな方向へスーッと泳ぐという泳ぎ方をしている（図3; Jones and Aizawa, 1991）。なめらかな泳ぎとタンブリングの切り替えは、べん毛の回転方向を逆にすることによっておこなわれている。この一見ブラウン運動にも似た動きを、酔っぱらいの足どりに例えて、ランダムウォーク（酔歩）と呼んでいる。細菌は、このランダムウォークにバイアスをかけることによって、走性を実現している。つまり、好ましい方向（例えば、誘因物質の濃度が上昇する方向）へ向かっているときにはタンブリング頻度を減少させ、そうでないときにはタンブリング頻度を上げているのである。

¹ 本項は今榮(1990)の文献を参考にした。

細菌は常に動き続けている。それに加えて方向も常に変えている。細菌があまりにも小さいために、このような一見無駄の多い戦略が採用されたと考えられる。例えば、ブドウ糖（細菌の誘因物質のひとつ）の濃度が1cmで1mM変化している環境を考える。大きさが0.1mm程度（ゾウリムシなどの原生動物の大きさ）であれば、細胞の端から端までで10 μ Mの濃度変化があるので、どちらの方向にブドウ糖があるのか検出できる（細菌は1 μ M程度まで検出感度を持っている；Macnab, 1987）。しかし、細菌の大きさは1 μ m程度しかないので、細胞の端と端の濃度差を利用するためには0.1 μ Mの検出感度が必要になり、細菌はもっと高性能の検出器を備えなければならなくなる。実際には、細菌はより高感度な検出器を開発するかわりに、常に動き回るという戦略を採っている。このようにして実質的に大きな体を持っているのと同等の効果を獲得したが、空間的な変化を時間的な変化に変換する戦略であるという見方もできる。つまり、細菌は化学物質の時間的な濃度変化を検出するシステムを採用したので、検出器の感度以上にシステム全体の感度を実質上向上させることができたと言える。

常に動き回る戦略を採用すると、もっともよい点に到達してもそこに留まることはできない。停止というモードがないからである¹。細菌の集団を観察すると、ブドウ糖濃度のもっとも高い点を中心に、広く分布していることがわかる。この性質は一見洗練されていないように感じるが、局所的な極大点に落ち込まないという、種の存続にとって重要な特長も細菌にもたらした。どんなによい環境があったとしても、自然界ではそれは長くは続かないので、一点にすべての個体が集まってしまつては全滅のおそれがあるのである。

細菌の走性の中で、化学物質に反応する走化性をもっとも詳しく研究されている。細菌の走化性応答には、時間スケールの異なるふたつの反応がある。ひとつは反応時間が短い「興奮（excitation）」で、もうひとつは長い「適応（adaptation）」である。走化性物質（誘因物質あるいは忌避物質）の濃度変化に直ちに対応してタンブリング頻度を変化させる反応が興奮で、感度はこれによって決まる。一方、適応は興奮よりも1桁から2桁長い時間スケールの反応で、走化性物質の濃度変化がなくなったときにタンブリング頻度を適切な値に引き戻す。適応によって実効的にダイナミックレンジを広げているとすることができる。適応がなければ、細菌は走化性物質濃度の絶対値に応じたタンブ

¹ 例外的に *Halobacterium* のように停止モードを持つ細菌も存在するが、その行動は本文の説明と本質的には変わらない。

リング頻度で行動することになり、自然界の広い濃度範囲に対応することはできなかったであろう。

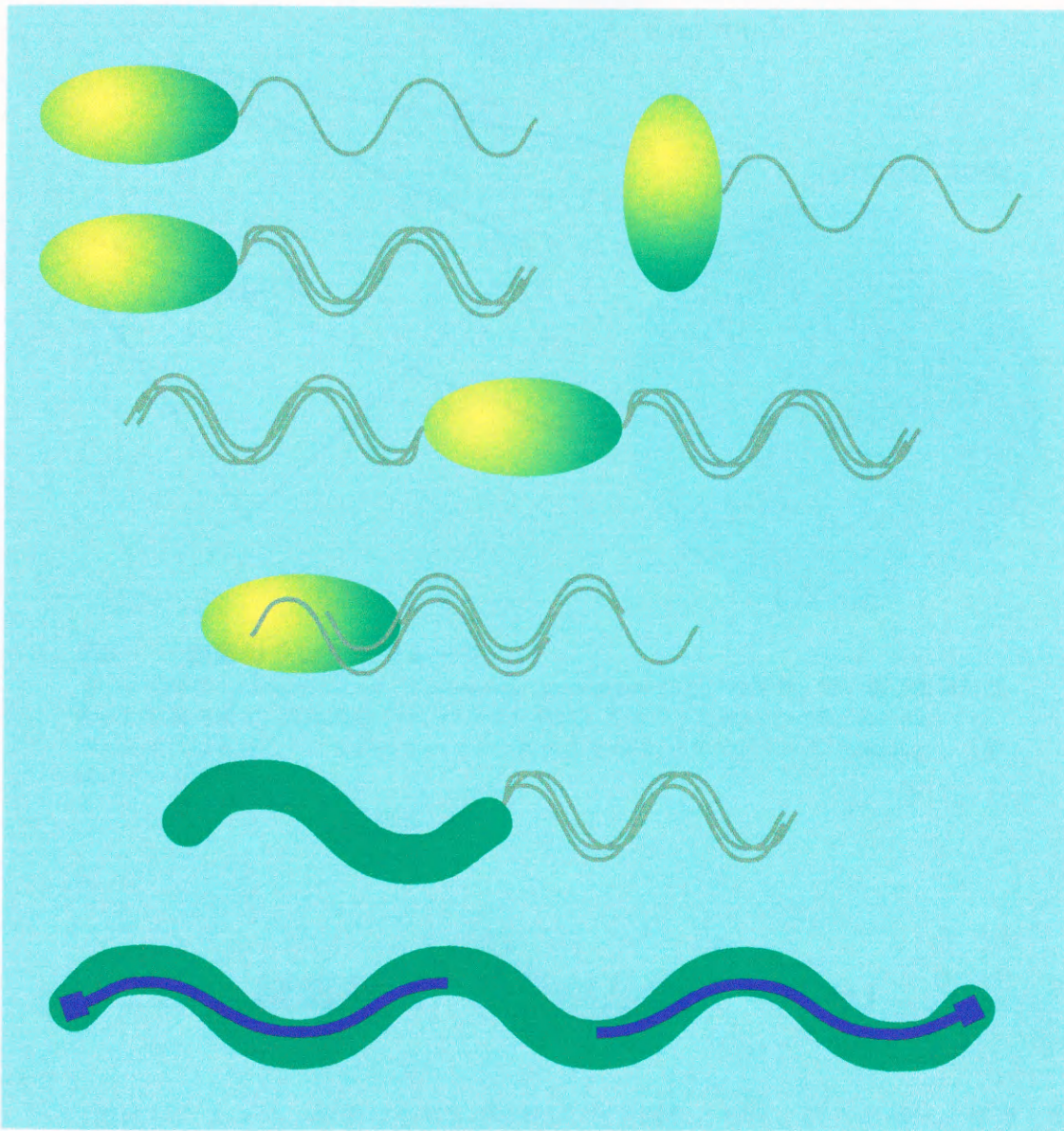


図2 細菌のべん毛型。

細菌は基本的には回転するべん毛を運動器官としている。ここで示したように、べん毛の生える位置や本数によって様々な型が存在する。

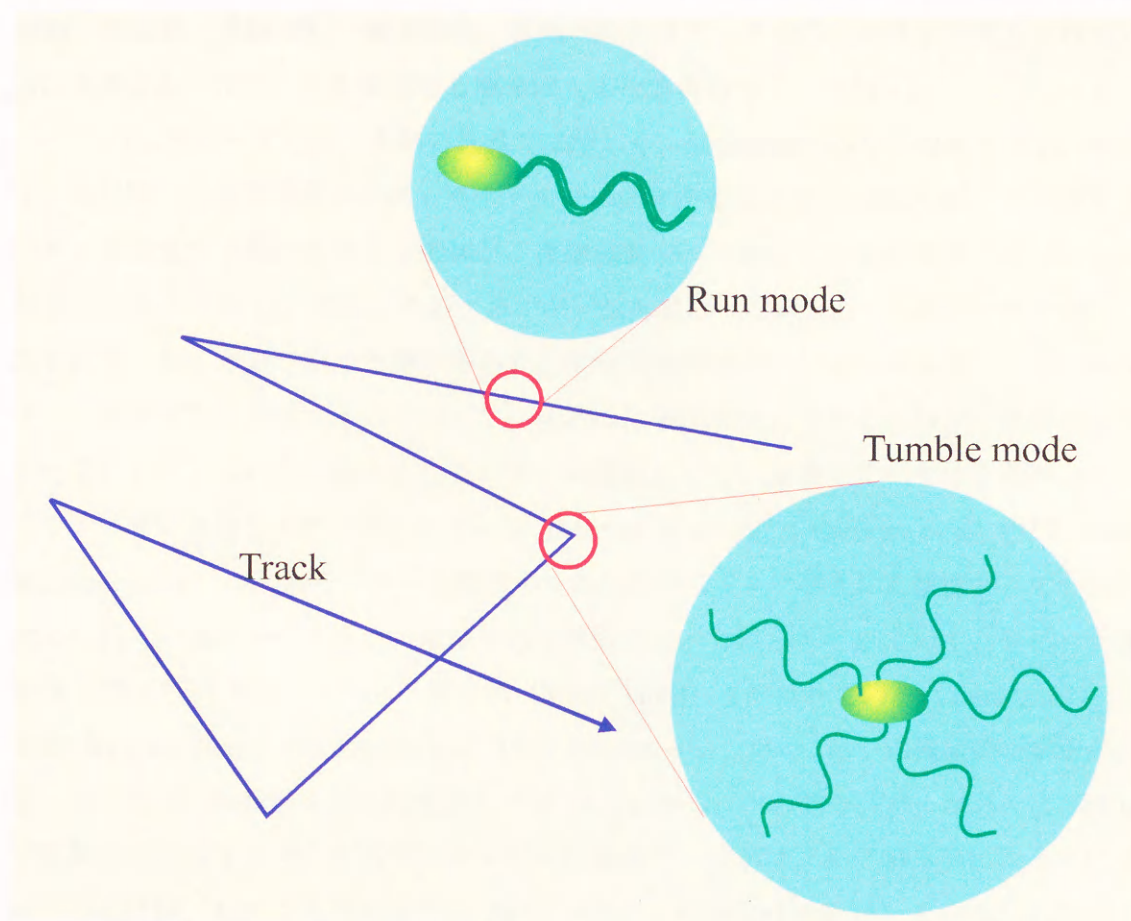


図3 細菌のランダムウォーク。

周べん毛細菌 (*Escherichia coli* や *Salmonella typhimurium* など) の場合。青い線が細菌が遊泳した軌跡を表す。直線部分では、べん毛を束にしてスーッと泳いでいる。角の部分では、べん毛束はばらけこぼれまわっているように見えるので、「タンブリング (tumbling)」と呼ばれている。

2.1.3 細菌運動の源「べん毛モーター」

前述したように、細菌はらせん形のべん毛を回転させて、自らの菌体を推進している。べん毛を回転させる原動力は、べん毛の根元にある、細胞膜に埋め込まれた「べん毛モーター」である。べん毛モーターは力学的エネルギーを発生する生体分子機械で、タンパク質からできている。力学的エネルギーを発生する他の生体分子機械としては、アクチン・ミオシン系、微小管・ダイニン系、微小管・キネシン系などがあり、筋肉や

細胞分裂装置、真核細胞の鞭毛纖毛、細胞内輸送など、さまざまな用途に使用されている。生物においても、力を発生する機械は大事な要素のひとつである。

べん毛モーターは、生物の世界では珍しく、回転運動する分子機械である。そして、時計回りにも反時計回りにも発生トルクの向きを変えることができる¹。力学的エネルギーを発生する他の生体分子機械が、直線運動で一方向にしか力を発生しないのとは対照的である（表 1）。また、そのエネルギー源も異なっており、べん毛モーターでは、ある決まったイオンがつくる細胞膜を介した電気化学的ポテンシャル差を、力学エネルギー（トルク）に変換するのに対して、後者の分子機械は ATP と ADP の自由エネルギー差を利用している。媒介となるイオンの種類として、水素イオンを使うものとナトリウムイオンを使うものが知られている（Manson et al., 1977; Matsuura et al., 1977; Hirota and Imae, 1983）。べん毛モーターを構成する部品の中でトルク発生に直接関わっていると考えられているタンパク質は、遺伝学的な解析などから絞られてきていて、スイッチ複合体（FliG, FliM, FliN）とモット複合体（MotA, MotB）と呼ばれている（Yamaguchi et al., 1986; Blair and Berg, 1990; Francis et al., 1994; Oosawa et al., 1994）。電子顕微鏡的な解析からは、その大まかな構造も知られてきた（図 4）。しかし、べん毛モーターがどのようにして電気化学的エネルギーを力学エネルギーに変換するのかは、まだ明らかになっていない。そこには、私たち人間がまだ気づいていない、巧妙な仕組みがあるかもしれないと期待されている。この観点からも、べん毛モーターをはじめとする、力を発生する生体分子機械の動作メカニズムの解明の研究は注目されている。

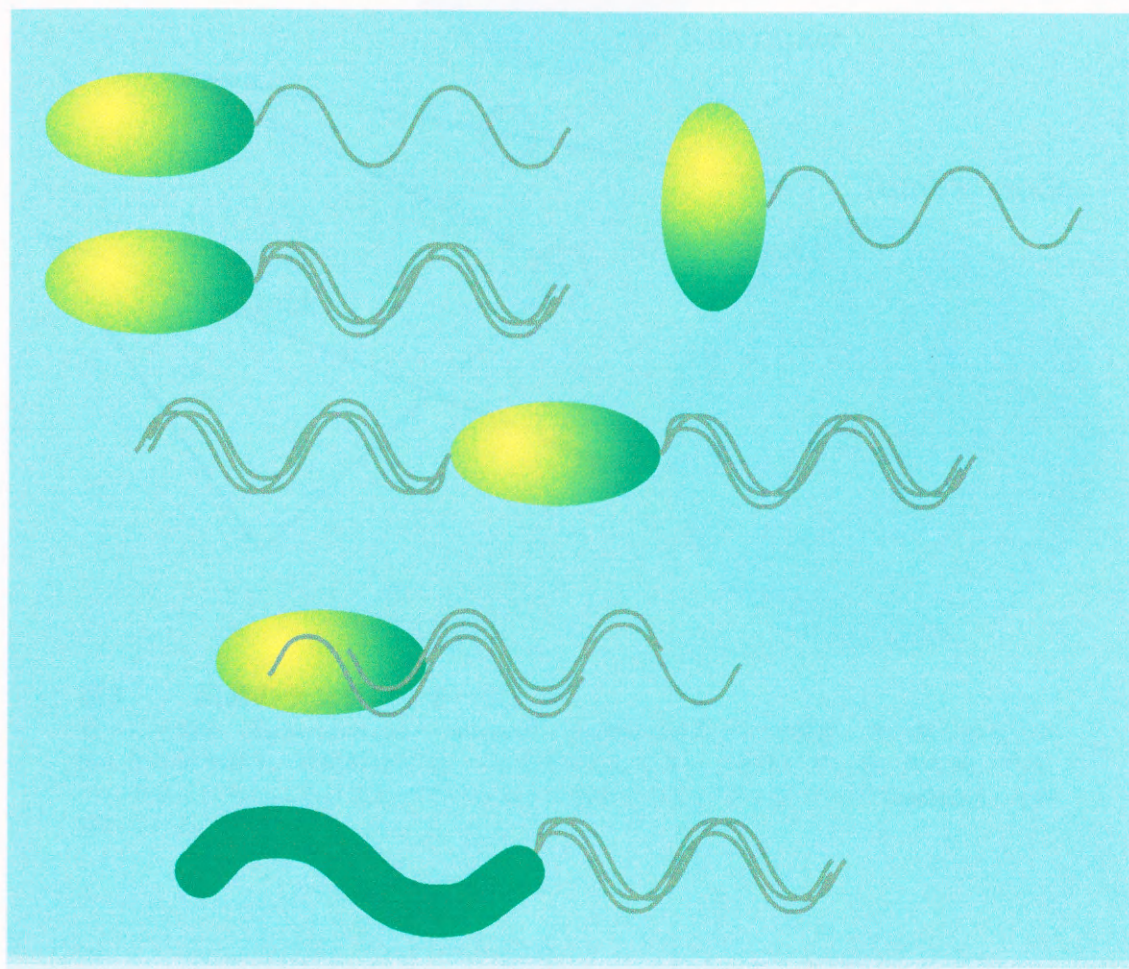
表1 力学的エネルギーを発生する代表的な生体分子機械。

	べん毛モーター	アクチン・ ミオシン	微小管・ ダイニン	微小管・ キネシン
運動方向	回転、両方向	直線、一方向	直線、一方向	直線、一方向
エネルギー源	$\Delta\tilde{\mu}_i$	ATP	ATP	ATP
生物	細菌、古細菌	真核生物	真核生物	真核生物
存在場所	細胞膜上	細胞質	細胞質	細胞質

$\Delta\tilde{\mu}_i$ は、あるイオン i （べん毛モーターの場合は水素イオンまたはナトリウムイオン）の細胞膜を介した電気化学的ポテンシャル差を表す。

¹ べん毛の先端から菌体に向かってべん毛を見たときのべん毛の回転方向を基準にしている。*S. typhimurium* の場合、べん毛は左巻きらせんなので、反時計回転のときになめらかに泳ぎ、時計回転のときにタンブリングする。

リング頻度で行動することになり、自然界の広い濃度範囲に対応することはできなかったであろう。



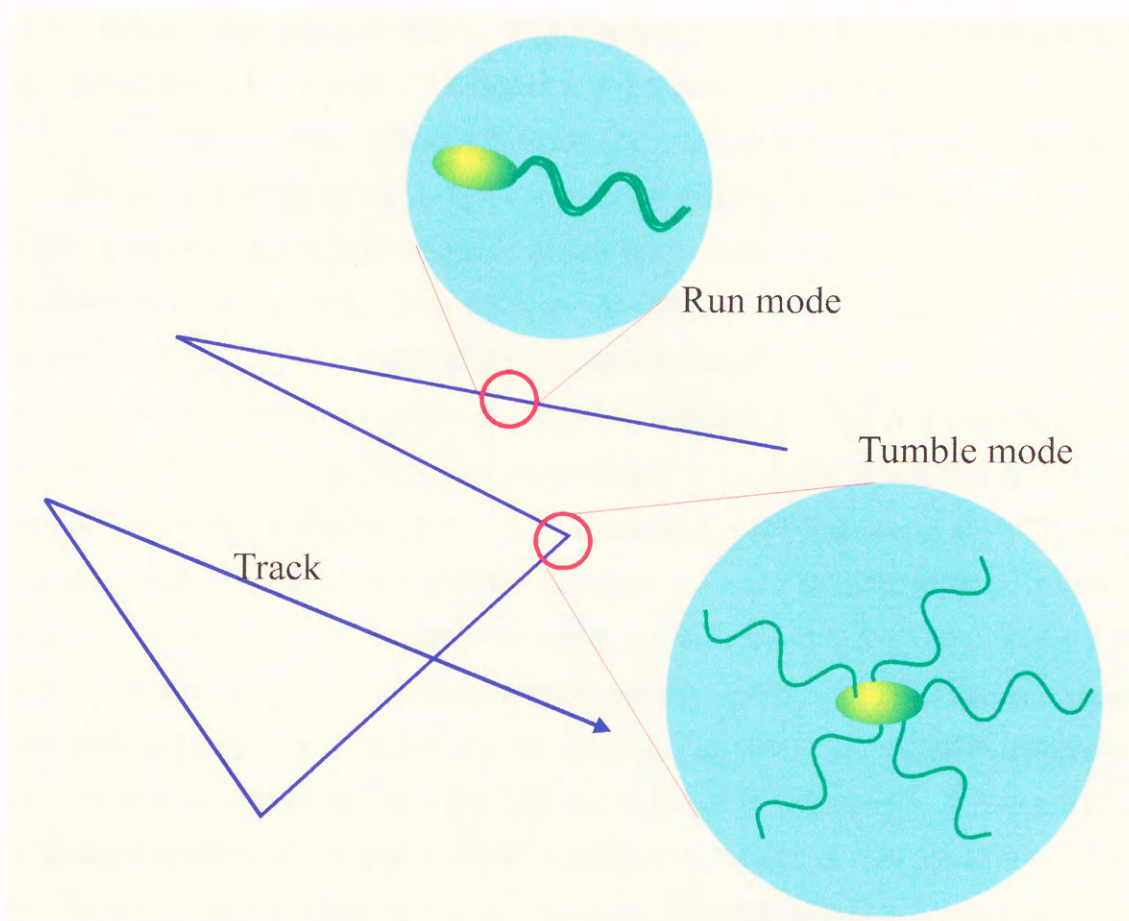


図3 細菌のランダムウォーク。

周べん毛細菌 (*Escherichia coli* や *Salmonella typhimurium* など) の場合。青い線が細菌が遊泳した軌跡を表す。直線部分では、べん毛を束にしてスーッと泳いでいる。角の部分では、べん毛束はばらけころげまわっているように見えるので、「タンブリング (tumbling)」と呼ばれている。

2.1.3 細菌運動の源「べん毛モーター」

前述したように、細菌はらせん形のべん毛を回転させて、自らの菌体を推進している。べん毛を回転させる原動力は、べん毛の根元にある、細胞膜に埋め込まれた「べん毛モーター」である。べん毛モーターは力学的エネルギーを発生する生体分子機械で、タンパク質からできている。力学的エネルギーを発生する他の生体分子機械としては、アクチン・ミオシン系、微小管・ダイニン系、微小管・キネシン系などがあり、筋肉や

細胞分裂装置、真核細胞の鞭毛繊毛、細胞内輸送など、さまざまな用途に使用されている。生物においても、力を発生する機械は大事な要素のひとつである。

べん毛モーターは、生物の世界では珍しく、回転運動する分子機械である。そして、時計回りにも反時計回りにも発生トルクの向きを変えることができる¹。力学的エネルギーを発生する他の生体分子機械が、直線運動で一方向にしか力を発生しないのとは対照的である（表 1）。また、そのエネルギー源も異なっており、べん毛モーターでは、ある決まったイオンがつくる細胞膜を介した電気化学的ポテンシャル差を、力学エネルギー（トルク）に変換するのに対して、後者の分子機械は ATP と ADP の自由エネルギー差を利用している。媒介となるイオンの種類として、水素イオンを使うものとナトリウムイオンを使うものが知られている（Manson et al., 1977; Matsuura et al., 1977; Hirota and Imae, 1983）。べん毛モーターを構成する部品の中でトルク発生に直接関わっていると考えられているタンパク質は、遺伝学的な解析などから絞られてきていて、スイッチ複合体（FliG, FliM, FliN）とモット複合体（MotA, MotB）と呼ばれている（Yamaguchi et al., 1986; Blair and Berg, 1990; Francis et al., 1994; Oosawa et al., 1994）。電子顕微鏡的な解析からは、その大まかな構造も知られてきた（図 4）。しかし、べん毛モーターがどのようにして電気化学的エネルギーを力学エネルギーに変換するのかは、まだ明らかになっていない。そこには、私たち人間がまだ気づいていない、巧妙な仕組みがあるかもしれないと期待されている。この観点からも、べん毛モーターをはじめとする、力を発生する生体分子機械の動作メカニズムの解明の研究は注目されている。

表1 力学的エネルギーを発生する代表的な生体分子機械。

	べん毛モーター	アクチン・ミオシン	微小管・ダイニン	微小管・キネシン
運動方向	回転、両方向	直線、一方向	直線、一方向	直線、一方向
エネルギー源	$\Delta\tilde{\mu}_i$	ATP	ATP	ATP
生物	細菌、古細菌	真核生物	真核生物	真核生物
存在場所	細胞膜上	細胞質	細胞質	細胞質

$\Delta\tilde{\mu}_i$ は、あるイオン i （べん毛モーターの場合は水素イオンまたはナトリウムイオン）の細胞膜を介した電気化学的ポテンシャル差を表す。

¹ べん毛の先端から菌体に向かってべん毛を見たときのべん毛の回転方向を基準にしている。*S. typhimurium* の場合、べん毛は左巻きらせんなので、反時計回転のときになめらかに泳ぎ、時計回転のときにタンブリングする。

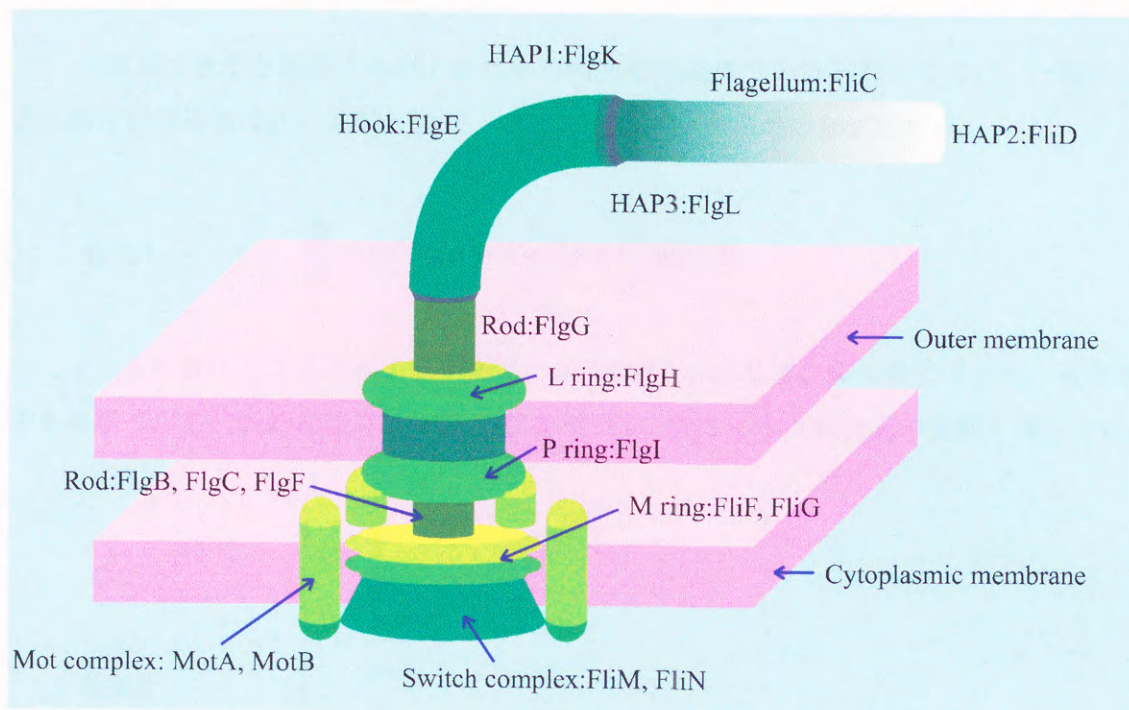


図4 ベン毛モーター・ベン毛の模式図。

スイッチ複合体の構成要素は従来遺伝学的解析により FlhG、FlhM、FlhN タンパク質ということになっていたが、最近の分子生物学的あるいは生化学的な研究から FlhG はMリングとの結合が強いことがわかってきた (Oosawa et al., 1994) ので、ここでは FlhG をMリングの構成要素とした。

2.2 低レイノルズ数の世界¹

ここまで細菌の運動の特徴を概観した。以下の節で、細菌運動の場である微小世界の力学上の特徴として、低レイノルズ数の流体力学とブラウン運動をとりあげ、その特徴を整理する。

¹ 本節は、巽(1982)の教科書を参考にした。

2.2.1 レイノルズ数

細菌は水中を運動するが、水は非圧縮性粘性流体であると考えてよい。一般に、非圧縮性粘性流体は次の運動方程式、ナビエ・ストークスの方程式に従う。

$$\text{数式1} \quad \frac{\partial \mathbf{u}}{\partial t} + (\mathbf{u} \cdot \nabla) \mathbf{u} = -\frac{1}{\rho} \nabla p + \frac{\mu}{\rho} \Delta \mathbf{u} + \mathbf{K}$$

ここで、未知数は速度 \mathbf{u} と圧力 p である。 ρ は密度、 μ は粘度、 \mathbf{K} は外力である。流体運動を特徴づける代表的な長さ L と速度 U を用いて、次のように無次元の変数を導入する。

$$\text{数式2} \quad \begin{cases} \mathbf{x}' = \frac{\mathbf{x}}{L} \\ t' = \frac{t}{(L/U)} \\ \mathbf{u}' = \frac{\mathbf{u}}{U} \\ p' = \frac{p}{(\rho U^2)} \end{cases}$$

これを用いて、外力がない場合（あるいは、外力が保存力である場合；補足参照）において、数式1を書き直すと、

$$\text{数式3} \quad \frac{\partial \mathbf{u}'}{\partial t'} + (\mathbf{u}' \cdot \nabla) \mathbf{u}' = -\nabla' p' + \frac{1}{R_e} \Delta' \mathbf{u}'$$

となる。ただし、

$$\text{数式4} \quad R_e = \frac{\rho L U}{\mu}$$

であり、この無次元数はレイノルズ数と呼ばれている。数式3はレイノルズ数だけをパラメーターとして含むので、「レイノルズ数が等しければ流れの場は相似である」というレイノルズの相似法則が導かれる。つまり、流体のシミュレーションをおこなう場合、同

じ流体を使って縮尺を 1/100 にするならば、速さを 100 倍にしなければならない。同じ速さでシミュレーションしたければ、縮尺が 1/100 のとき粘性も 1/100 にしなければならない。

次に、細菌運動のレイノルズ数を求める。菌体の大きさは約 $1\mu\text{m}$ 、遊泳速度は約 $30\mu\text{m/s}$ であり、水中を泳いでいるので、 25°C のとき、

$$\text{数式5} \quad \begin{cases} L \approx 1(\mu\text{m}) = 1 \times 10^{-6}(\text{m}) \\ U \approx 30(\mu\text{m/s}) = 3 \times 10^{-5}(\text{m/s}) \\ \rho \approx 1.0(\text{g/ml}) = 1 \times 10^3(\text{kg/m}^3) \\ \mu \approx 0.89(\text{cP}) = 8.9 \times 10^{-4}(\text{Pa}\cdot\text{s}) \end{cases}$$

である。したがって、細菌運動のレイノルズ数は、

$$\text{数式6} \quad R_e \approx \frac{1 \times 10^3 \times 1 \times 10^{-6} \times 3 \times 10^{-5}}{8.9 \times 10^{-4}} = 3.4 \times 10^{-5}$$

である。

一方、人間が水泳するときは、

$$\text{数式7} \quad \begin{cases} L \approx 1(\text{m}) \\ U \approx 1(\text{m/s}) \\ \rho \approx 1.0(\text{g/ml}) = 1 \times 10^3(\text{kg/m}^3) \\ \mu \approx 0.89(\text{cP}) = 8.9 \times 10^{-4}(\text{Pa}\cdot\text{s}) \end{cases}$$

なので、レイノルズ数は

$$\text{数式8} \quad R_e \approx \frac{1 \times 10^3 \times 1 \times 1}{8.9 \times 10^{-4}} = 1.1 \times 10^6$$

である。これは、細菌が人間よりもずっと苦勞して泳いでいることを示している。仮に、人間が細菌の苦勞を体験したいとすると、水の 3×10^{10} 倍も粘性の高い流体中を水中と同じ速度で泳がなければならない。このような粘度は市販の粘度計では測定範囲を超えており、細菌の驚異的な能力（がまん強さ？）に感心するしかない。

2.2.2 細菌運動の時定数

レイノルズ数は慣性力と粘性力の比であると、おおざっぱな言い方をされる場合があるが、それは次の理由からである。数式1の左辺は流体の加速度を表すのでこれを慣性項といい、右辺第1項を圧力項、第2項を粘性項という。さきほどの L と U を使ってそれぞれの項の大きさを見積もると、

$$\text{数式9} \quad \begin{cases} \frac{\partial}{\partial t} \approx \frac{U}{L} \\ \nabla \approx \frac{1}{L} \\ \Delta \approx \frac{1}{L^2} \end{cases}$$

なので、慣性項と粘性項の比は、

$$\text{数式10} \quad \frac{\text{慣性項}}{\text{粘性項}} \approx \frac{U^2/L}{\mu U / \rho L^2} = \frac{\rho U L}{\mu} = R_e$$

となる。

ナビエ・ストークスの方程式（数式1）は非線形方程式だが、細菌の運動はレイノルズ数がたいへん小さいので、左辺第2項の非線形項を無視して線形近似することができる（ストークス近似）。こうすることによって、さまざまな問題を解析的に解くことができるようになる。その結果得られる重要な性質は、流体中の物体に働く力（粘性抵抗力）が流体の速度に比例するということである。

ただし、レイノルズ数は流体の性質を表しているのであって、流体中を運動する物体の慣性とそれに働く粘性抵抗力には何の関係もない。そこで、細菌の運動について、直接運動方程式から考察する。細菌が発生する推進力を F 、流体から受ける粘性抵抗力は細菌の速度に比例するので αv (α は負) とすると、運動方程式は次のように書くことができる。

数式11
$$m \frac{dv}{dt} = F + \alpha v$$

この方程式の一般解は、

数式12
$$v = v_0 \exp\left[\frac{\alpha}{m}t\right] - \frac{F}{\alpha}(1 - \exp\left[\frac{\alpha}{m}t\right])$$

である（図5）。ただし、 v_0 は初期速度である。したがって、 $-F/\alpha$ は定常状態の速度、 $-m/\alpha$ は時定数になる。

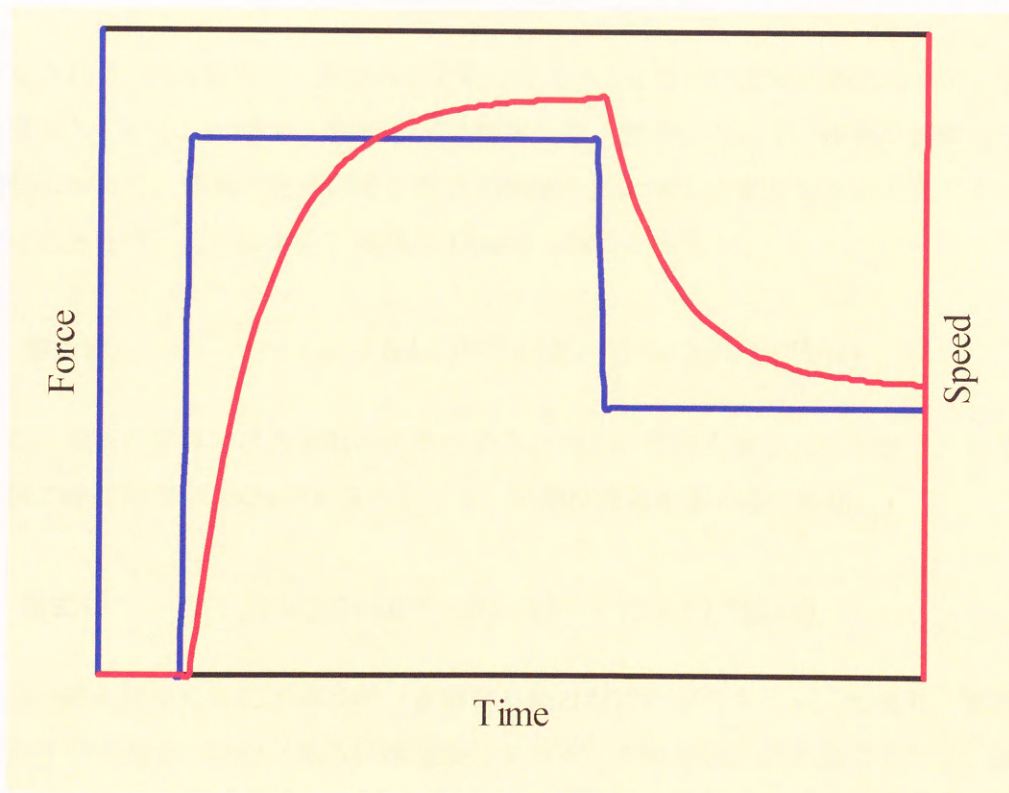


図5 流体中の物体の運動。

粘性流体中の物体に働く力が青線のように変化したときの、物体の速度の変化（赤線）を示す。ある時間経過したあには速度の変化はなくなる。細菌の場合には、時定数が約 10ns ときわめて短い。

ここで、細菌菌体を直径 $1\mu\text{m}$ 、比重 1 の球とすると、

$$\begin{aligned} \text{数式13} \quad m &= \frac{4}{3}\pi a^3 \rho = \frac{4 \times 3.14 \times (0.5 \times 10^{-6})^3 \times 1 \times 10^3}{3} \\ &= 5.2 \times 10^{-16} (\text{kg}) \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{数式14} \quad \alpha &= -6\pi\mu a = -6 \times 3.14 \times 8.9 \times 10^{-4} \times 0.5 \times 10^{-6} \\ &= -8.4 \times 10^{-9} (\text{N} \cdot \text{s} / \text{m}) \end{aligned}$$

となるので、時定数は、

$$\text{数式15} \quad -\frac{m}{\alpha} = \frac{5.2 \times 10^{-16}}{8.4 \times 10^{-9}} = 6.2 \times 10^{-8} (\text{s})$$

と計算される。この結果は、推進力が変化しても $0.1\mu\text{s}$ 後には定常状態になってしまうことを意味している。つまり、私たちが通常おこなう測定において、細菌の運動は常に定常状態にあって、細菌の速度はその時点の推進力に比例した量であると考えてよい。推進力の大きさは、上で仮定した細菌が $30\mu\text{m/s}$ で泳ぐとすると、

$$\text{数式16} \quad F = -\alpha v = 8.4 \times 10^{-9} \times 30 \times 10^{-6} = 2.5 \times 10^{-13} (\text{N})$$

となる。細菌の世界では力を出すのを止めたとたんに運動も止まってしまう。したがって、仮に推進効率が 100% であるとしても、細菌は菌体を進めるために、

$$\text{数式17} \quad Fv = 2.5 \times 10^{-13} \times 30 \times 10^{-6} = 7.5 \times 10^{-18} (\text{J} / \text{s})$$

だけは、絶え間なく常にエネルギーを消費し続けなければならない。つまり、私たち人間の世界では慣性の法則（あるいは運動エネルギーの保存則）が実感できても、細菌の世界では運動エネルギーは散逸するものとしか感じられない。ニュートンがもしも細菌の世界で暮らしていたならば、運動方程式は、「加速度は力に比例する」ではなくて、「速度は力に比例する」という形になっていたに違いない。

ちなみに、細菌の並進運動の運動量と運動エネルギーを計算すると、

$$\text{数式18} \quad mv = 5.2 \times 10^{-16} \times 30 \times 10^{-6} = 1.6 \times 10^{-20} (\text{kg} \cdot \text{m} / \text{s})$$

$$\text{数式19} \quad \frac{1}{2}mv^2 = \frac{1}{2} \times 5.2 \times 10^{-16} \times (30 \times 10^{-6})^2 = 2.3 \times 10^{-26} (\text{J})$$

である。一方、速度 1m/s で運動している一辺 10cm、比重 1 の立方体の運動量と運動エネルギーは、

$$\text{数式20} \quad mv = 1 \times 1 = 1 (\text{kg} \cdot \text{m} / \text{s})$$

$$\text{数式21} \quad \frac{1}{2}mv^2 = \frac{1}{2} \times 1 \times 1^2 = 0.5 (\text{J})$$

となる。細菌と比べると、運動量に対する運動エネルギーの比の大きさが約 6 桁違い、蓄えられている運動エネルギーの大きさに極端に差があることがわかる。

2.3 ブラウン運動の世界

細菌の運動を観察するために顕微鏡を覗くと、細菌以外にも、運動をしている菌体と同程度の大きさの微小な粒子を観察することができる。ただし、こちらはあまり大きな運動はせずに、ちょこちょこことせわしなく動いている。これがブラウン運動であり、ブラウン運動をする粒子はブラウン粒子と呼ばれている。ブラウン運動は決して生物が関与しているわけではなく、流体を構成する分子が熱運動していて、それらがブラウン粒子に衝突することが原因であるということがわかっている。このブラウン運動の機構は、理論的にはアインシュタインによって、実験的にはペランによって、証明された(米沢、1986)。この機構を考えれば、ブラウン運動のさまざまな性質は矛盾なく説明される。例えば、ブラウン運動は、粒子が小さいほど、流体の粘性が小さいほど、温度が高いほど、活発になり、光や磁界、電界の影響を受けないという現象などが説明できる。

流体分子がブラウン粒子に衝突してブラウン運動が起こっているとすると、熱力学の要請である「エネルギー等分配則」がブラウン運動にも適用されるはずである。つ

まり、ブラウン粒子も流体と熱平衡にあって、流体分子の平均の並進運動のエネルギーと、ブラウン粒子の平均の並進運動のエネルギーは等しくなっていなければならない。

細菌は水中で運動するので、まず水分子の運動エネルギーを見積もってみよう。エネルギー等分配則によると、並進運動のエネルギーは

$$\text{数式22} \quad \frac{3}{2} \frac{RT}{N_A} = 6.2 \times 10^{-21} (\text{J})$$

となる。ただし、 R は気体定数 ($8.3 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$)、 T は温度 (300 K)、 N_A はアボガドロ数 ($6.0 \times 10^{23} \text{ mol}^{-1}$) として計算した。

ちなみに、水 1 分子の質量は $18 \times 1.7 \times 10^{-27} (\text{kg})$ であるので、平均の速度は

$$\text{数式23} \quad \left\langle \sqrt{v_{\text{H}_2\text{O}}^2} \right\rangle = \sqrt{6.2 \times 10^{-21} \times \frac{2}{18 \times 1.7 \times 10^{-27}}} = 410 (\text{m/s})$$

となり、かなり大きな値を持っていることがわかる。水分子の運動量は、

$$\begin{aligned} \text{数式24} \quad m_{\text{H}_2\text{O}} \left\langle \sqrt{v_{\text{H}_2\text{O}}^2} \right\rangle &= 18 \times 1.7 \times 10^{-27} \times 410 \\ &= 1.3 \times 10^{-23} (\text{kg} \cdot \text{m/s}) \end{aligned}$$

と計算される。水分子と細菌の運動の力学的なパラメーターを表 2 にまとめた。水分子が細菌菌体に衝突して細菌のブラウン運動が起こることを考えると、水分子の運動量が細菌の運動量よりも 3 桁も小さいのは意外に思えるかもしれない。しかし、流体中の分子運動では、すべてが平均速度で運動しているわけではないことに注意しなければならない。ほとんどの分子は速度 0 に近いが、ごく少数の分子はとてつもなく速い速度を持っているのである。したがって、細菌の運動量に匹敵する運動量を持つ水分子が存在することも考慮すると、細菌にとって水分子の衝突はけっして無視できるものではないと考えられる。

一方、水分子の運動エネルギーは異常に思えるほど大きく見える。これはまさに、19 世紀末の分子（その当時は原子と考えていた）の概念確立のときに、物理学者に立ちふさがった問題であった。この問題の答えは、すでに述べたように、微小世界では慣性によって運動エネルギーを蓄えることができないことである。数式 15 で示されている

ように、細菌は約 $0.1\mu\text{s}$ 後には最初にもっていた速度を失ってしまい、その瞬間に働く力（べん毛回転による推進力）によって決まる速度で運動している。つまりこの時間中に最初にもっていた運動エネルギーを散逸してしまうのである。運動エネルギーの散逸のミクロなメカニズムは、結局は水分子との衝突による運動エネルギーの交換である。当然水分子どうしても常に衝突を繰り返しているが、水分子の熱運動は瞬間を考えているので、散逸によるエネルギーの減少は無視している。もし水分子も細菌と同じ時間スケールで運動を考えれば、速度が0になってしまうために、運動エネルギーも運動量も0になる。逆に、細菌の運動を水分子と同じ時間スケールで考えれば、マクロな意味で停止している細菌でさえ水分子とのエネルギー等分配則が成り立っているので、有限の運動エネルギーを持っているはずである。したがって、細菌よりも水分子のほうが5桁も大きな運動エネルギーをもっていると考えたよりは、このふたつの運動はまったく違う時間スケールなので直接比較するのはあまり意味がないと考えるほうが妥当である。

表2 水分子と細菌の運動の力学的なパラメーターの比較。

パラメーター	記号 (単位)	水分子	細菌
質量	m (kg)	3.1×10^{-26}	5.2×10^{-16}
速度	v (m/s)	410	3.0×10^{-5}
並進の運動量	mv (kg・m/s)	1.3×10^{-23}	1.6×10^{-20}
並進の運動エネルギー	$(1/2)mv^2$ (J)	6.2×10^{-21}	2.3×10^{-26}
エネルギーの散逸	Fv (J/s)	—	7.5×10^{-18}

水分子は熱運動なので、速度、運動量、運動エネルギーは平均値を示した。

2.4 まとめ

本章では、細菌の運動に関して基礎的な事項を整理した。細菌はきわめて細いらせん形の繊維「べん毛」を回転させることによって菌体を推進し、その回転方向を調節することによって走性を実現している。このような運動様式は行き先がはっきり決まっていけないので、私たちには洗練されていないように感じられる。しかし、細菌が活動の舞台としている微小世界は人間の世界の感覚とかなりずれている。それは、レイノルズ

数が小さいこと、ブラウン運動の影響が無視できないことが原因である。このような世界で、細菌は一見無駄が多い行動をしているが、実はうまく微小世界の特徴に合わせた戦略を採っているのではないかと考えられる。

2.5 補足

\mathbf{K} が保存力である場合（つまり、重力場や電場などの影響を受ける場合）を考えると、ポテンシャル Ω を使って、

$$\text{数式25} \quad \mathbf{K} = -\nabla\Omega$$

と書くことができるので、数式 1 は次のように書き直すことができる。

$$\text{数式26} \quad \frac{\partial \mathbf{u}}{\partial t} + (\mathbf{u} \cdot \nabla) \mathbf{u} = -\nabla \frac{p^*}{\rho} + \frac{\mu}{\rho} \Delta \mathbf{u}$$

ただし、

$$\text{数式27} \quad p^* = p + \rho\Omega$$

である。つまり、外力が働かない場合と同じ形の方程式になる。

3 レーザー暗視野顕微鏡の開発

第2章では細菌の運動様式について述べ、細菌が活動する微小世界の基礎的な力学的特徴を整理した。しかし、細菌の運動、特にべん毛モーターの特性を研究するために使える方法は数が少なく、さらに研究を進めようという場合には物足りないことが多い。そこで本章では、溶液の粘性を上げることなく自然の状態のべん毛1本の回転を測定するために新たに開発した「レーザー暗視野顕微鏡法」と、それを用いてべん毛モーターの回転数がきわめて急激に変化する現象の発見を報告する。

3.1 背景と目的

遊泳速度は細菌の運動性の指標としてもっとも簡単に利用できるパラメーターである。同じ細菌株どうしを条件を変えて比較したいときなどには、たいへん有効である。しかし、べん毛モーターの特性を直接調べたい場合は、系が複雑すぎて正確な値を得ることは難しい。

その点、テザードセル法（図6）はべん毛モーターの出力を直接観察できるので、べん毛モーターの出力トルクの測定などに利用されてきた（Manson et al., 1980）。つまり、テザードセルの粘性抵抗トルクは回転数に比例するので、それと釣り合っているべん毛モーターの発生トルクを求めることができるのである。最初にこの方法が使われたのは、べん毛が回転していることを直接証明した研究であった（Silverman and Simon, 1974）。しかしながら、テザードセル法にも欠点がある。べん毛モーターの負荷が、べん毛よりもずっと大きな菌体であることである。そのため通常のモーター回転数より低い回転数のデータしか得ることができない。

遊泳しているときのべん毛の回転数を測定するために、いくつかの手法が開発された。最初に画像記録を利用するという試みがされた。顕微鏡像を映画やビデオに記録して、そのべん毛の像を解析する方法である。しかし、通常の映画フィルムやビデオではべん毛の回転を記録するには遅すぎ、また、高速ビデオなどを利用するためには照明光をずっと強くしなければならず、細菌の活性に障害を与えてしまうというジレンマがあった。そのために、溶液の粘度を大きくしてべん毛の回転を遅くして測定する方法しか採用できなかった (Shimada et al., 1976)。

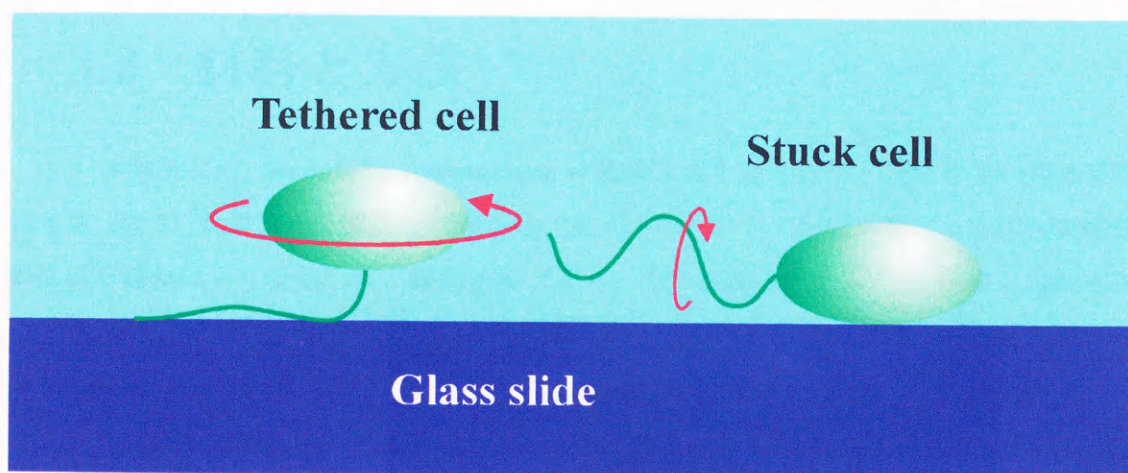


図6 テザーセルとスタックセルの概念図。

左がテザーセル法、右がスタックセル法である。どちらもべん毛モーター1個の特性を測定することができるが、対照的な性質を持っている。つまり、テザーセルは通常の顕微鏡（位相差顕微鏡など）で観測できるが、負荷が大きいため回転が遅くなってしまう。一方、スタックセルは負荷が小さいが、速く回転するべん毛を観測しなければならないので通常の顕微鏡法は使えない。

Lowe et al. (1987)は、遊泳している細菌の顕微鏡像の光強度をスペクトル解析し、その中にべん毛の回転に対応するスペクトルが含まれていることを発見した。この方法によって、*Escherichia coli* のべん毛束の回転数は 270rps にも達することが判明した。自然な状態のべん毛回転数を測定できるという点で、この方法はきわめて強力であると言える。しかし、残念ながら、べん毛束をまとめて測定してしまうこと、スペクトル解析をおこなうために時間分解能が制限され、時間平均しか見ることができないこと、とい

った欠点が存在するので、単一のべん毛モーターの時々刻々の変化を追跡するという用途には向かない。

べん毛モーターのトルク発生機構を解明するためには、単一のべん毛モーターの動作をなるべく時間分解能を上げて記録し、解析することが必要である。本章では、これを目的にしたべん毛回転計測法「レーザー暗視野顕微鏡」の開発と、それを用いて発見した現象について述べる。

3.2 材料と方法

本研究には *Salmonella typhimurium* の遊泳方向を変えることのできない突然変異体4株(表3)を用いた。細菌を液体培地(表4)中で37°Cで振盪培養し、後期対数増殖期に遠心操作により集菌した。観察溶液(表4)で一度洗ったあと、20倍量の観察溶液に懸濁した。この懸濁液3.5 μ lをスライドガラスに置き、カバーガラスでおおい、そのまわりをシリコンオイルで封印した。この状態で観察する温度(室温、あるいは30°C)に1時間静置し、嫌気的な条件にしてから、顕微鏡観察に用いた。

表3 研究に使われた細菌株。

細菌株	遺伝子型	表現型	入手源
SJW3076	$\Delta(\text{cheA-cheZ})$	smooth swimming	第6章参照
Sw ₈ (Δ Che)	$\Delta(\text{cheA-cheZ}), \text{fliM-6}$	smooth swimming	第6章参照
Sw ₃₀ (Δ Che)	$\Delta(\text{cheA-cheZ}), \text{fliG-10}$	smooth swimming	第6章参照
Sw ₄₉ (Δ Che)	$\Delta(\text{cheA-cheZ}), \text{fliM-19}$	smooth swimming	第6章参照

ここで使われた細菌株はすべて第6章の研究で分離されたものである。詳細は第6章を参照。

表4 *S. typhimurium* の培地、溶液の組成。

培地、溶液名	組成
液体培地	1% peptone, 0.5% yeast extract, 0.5% NaCl
観察溶液	10 mM potassium phosphate (adjust pH to 7.0), 10 mM glucose, 10 mM NH ₄ Cl, 1 mM cystein, 0.01% yeast extract, 0.1 mM EDTA

3.3 結果

3.3.1 レーザー暗視野顕微鏡の仕様と構成

3.3.1.1 らせんの回転に対応する信号を得る工夫

S. typhimurium は複数のべん毛を持っているが、泳いでいるときにはべん毛は束になっているので、1本1本を識別することはできない。菌体をガラスに固定したスタックセル (図 6) だと、個々のべん毛が菌体から放射状に広がり識別できる。通常の暗視野顕微鏡で観察すると、スタックセル上の止まっているべん毛は正弦波状に見える (図 7a)。ところが、細く絞ったレーザー光を一方向からべん毛に照射すると、らせん形のべん毛繊維の像はらせん周期に相当する点列として現れる (図 7b)。べん毛繊維の方向がレーザー光に対して垂直に近い部分は光を強く散乱し、平行に近い部分はあまり光を散乱しないので、このような像が得られるのだと考えられる。べん毛が回転すると、その速度に応じてらせん軸に沿って点列も移動する (図 7c)。つまり、らせん軸状の固定した点における輝度は、べん毛の回転に応じて増減する。したがって、その固定点の光強度を記録すれば、べん毛回転数を測定できるのである。

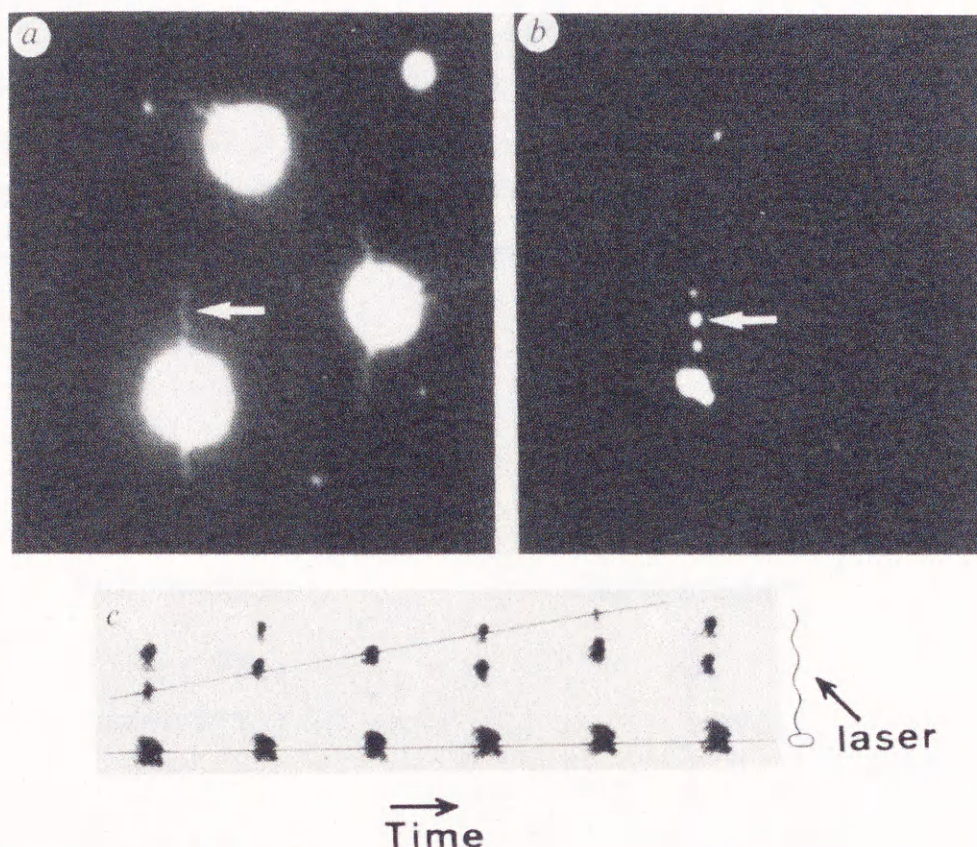


図7 細菌のレーザー暗視野顕微鏡像。

- (a) 通常の暗視野照明による細菌の顕微鏡像。菌体がガラスに固定されたスタックセルの状態の細菌を観察している。べん毛は回転していない。
- (b) レーザー暗視野照明による細菌の顕微鏡像。a と同一の視野。
- (c) べん毛が回転しているときのスタックセルのレーザー暗視野顕微鏡像の連続写真。左から右に時間が経過している。下側の大きな点が菌体の像で、時間とともに移動している点列はべん毛の像である。見やすくするために白黒を反転した。

3.3.1.2 スリットと像の位置を合わせる工夫

本研究で開発されたレーザー暗視野顕微鏡では、結像面に置いた適当な大きさのスリットを通過する光を光電子増倍管でフォトンカウンティングすることによって、らせん軸状の固定点の光強度が得られる。このとき大きな問題となったのが、べん毛の像をスリットの位置にいかにか正確に合わせるかということであった。べん毛とスリットの像を直接モニターするのがもっとも単純で確実なので、最初にハーフプリズムを用いる方法を考えた (図 8a)。しかしこの方法では光量を損失してしまい、確実にべん毛の像を

モニターするには光量が不足してしまった。例えば、1:1 に光を分割するハーフプリズムを使用した場合、理想的な光学系を構成できたとしても、光電子増倍管には顕微鏡から供給される光量の 50%、カメラへは 25%しか到達しない。そこでスリット付きミラーをそのまま光の分割に使う方法を本装置に適用した（図 8b）。この方法ならば、光電子増倍管へもカメラへも顕微鏡からの光量を 100%生かすことができる。

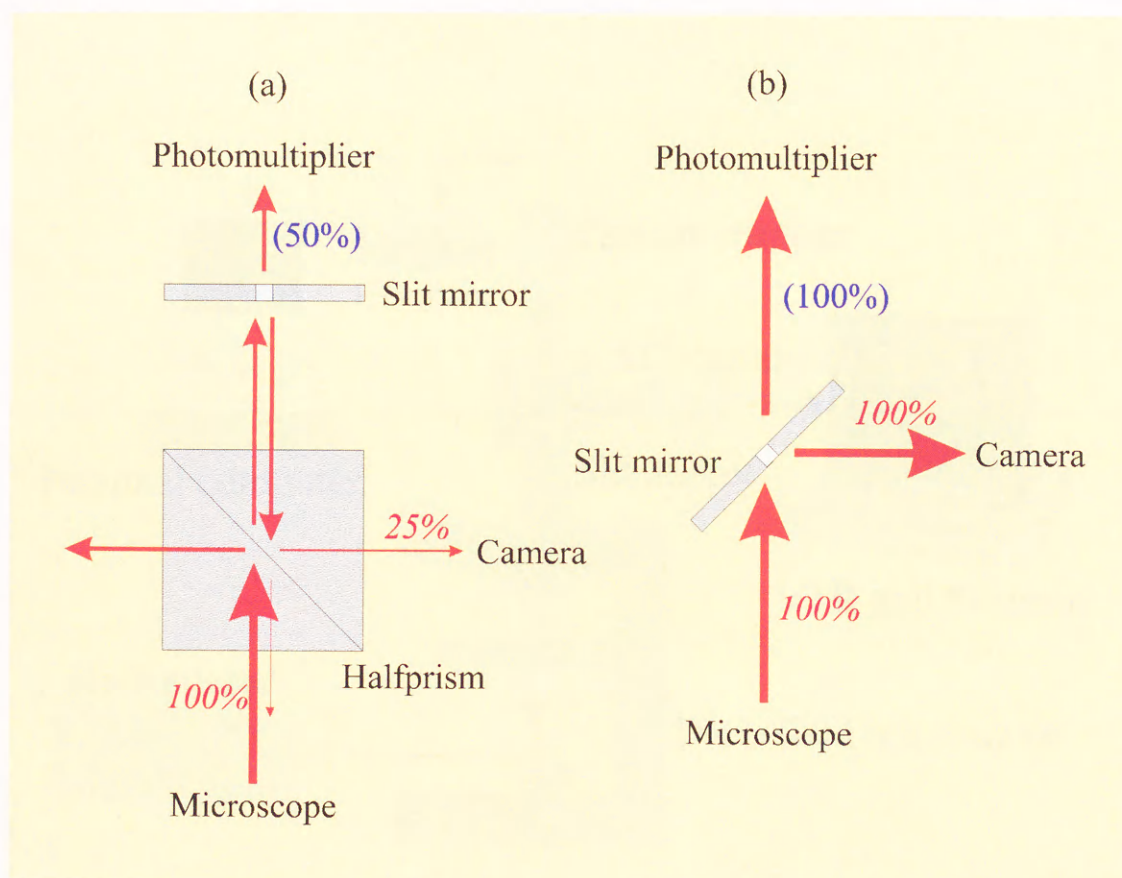


図8 ペン毛とスリットの位置を合わせるための光学系の模式図。

- (a) ハーフプリズムを用いる方法。カメラへは顕微鏡からの光量のうち 25%しか到達しない。
 (b) スリット付きミラーを用いる方法。顕微鏡からカメラへ 100%の光量が到達する。

3.3.1.3 構成

前述した測定原理を実現するために、図 9のように測定装置（レーザー暗視野顕微鏡）を構成した。それぞれの部品は表 5にまとめた。

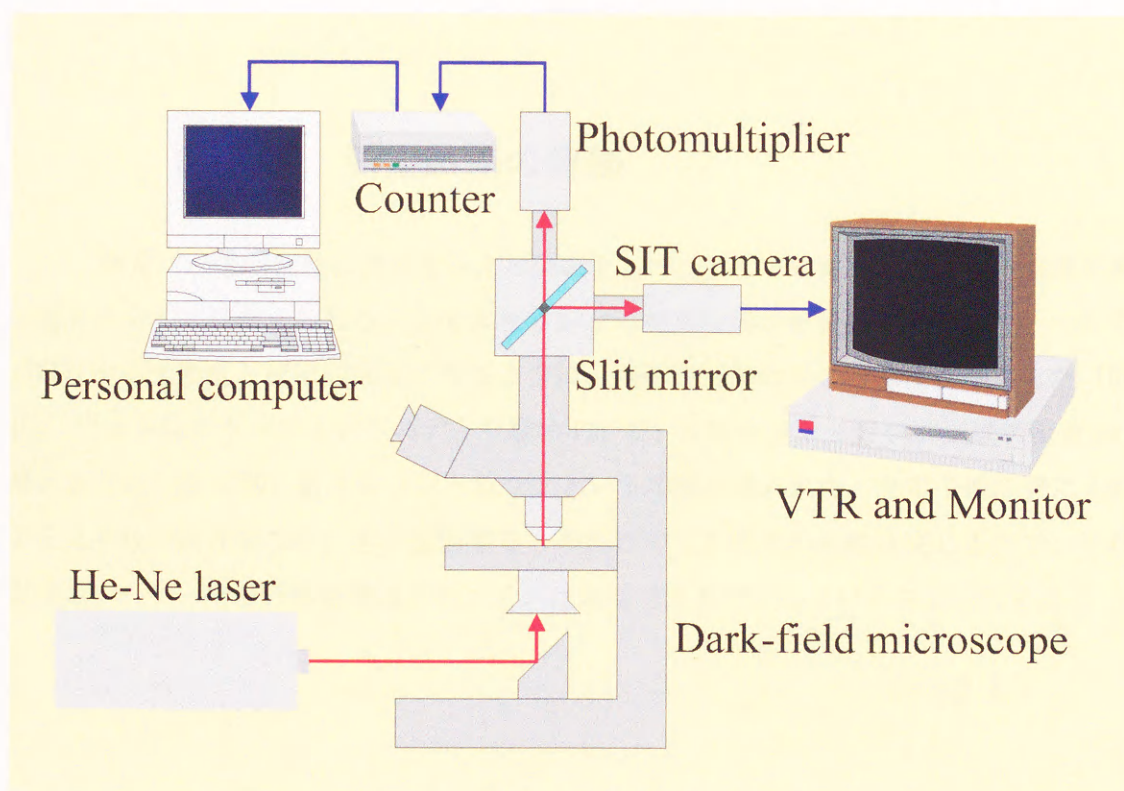


図9 レーザー暗視野顕微鏡の構成。

赤線は光路、青線は電気信号の流れを示す。画像データはビデオ記録され、ペン毛回転のデータはパソコンに記録される。

表5 レーザー暗視野顕微鏡の部品一覧。

部品	メーカー	型式
He-Ne レーザー (光源)	日本電気	GLG5800
暗視野コンデンサー	オリンパス	DCW 1.4-1.2
対物レンズ	ニコン	Plan 40X
リレーレンズ	ニコン	TV 1X
光電子増倍管	浜松ホトニクス	R649
フォトンカウンティング装置	浜松ホトニクス	C1050
カウンター	ヤトロ電子	(特別注文)
パーソナルコンピューター	日本電気	PC-9801VM
S I Tカメラ	浜松ホトニクス	C2400-08
ビデオレコーダー	ビクター	HR-S7000

3.3.1.4 測定誤差の評価

測定べん毛回転数に誤差を与える要因として、レーザー暗視野顕微鏡の装置自身の固有のノイズが考えられる。この大きさがどの程度なのかを見積もるために、べん毛が散乱する光強度とほぼ同程度になるように、菌体の近傍の点の光強度を測定した (図 10)。フォトンカウンティングのゲート数は 121 で、平均カウント数 1016、標準偏差 24、最大カウント数 1079、最小カウント数 952 という結果が得られた。光電子増倍管に入射する光子数の統計的なゆらぎに起因するものだけでこの程度の変動は生じるので、それ以外のレーザー暗視野顕微鏡固有のノイズは無視できるほど小さいと考えられる。

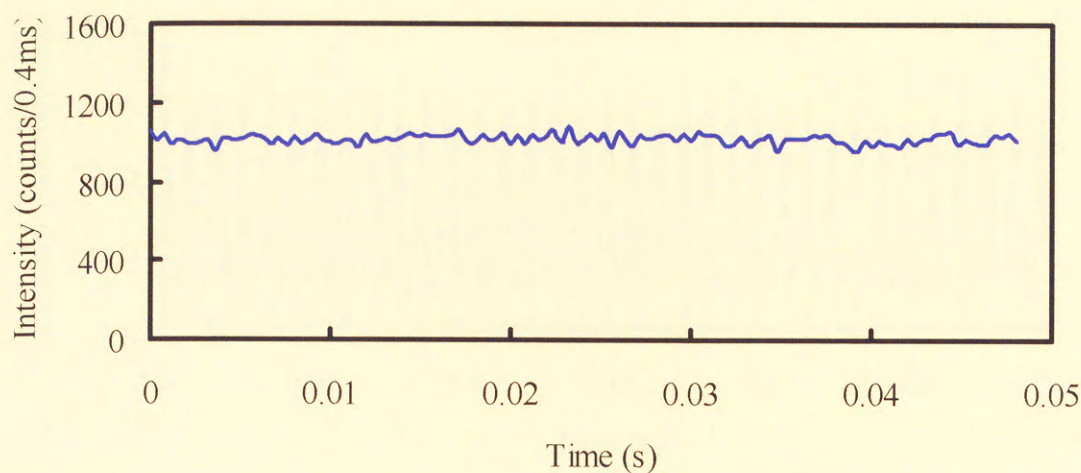


図10 レーザー暗視野顕微鏡のノイズの大きさ。

カウント数がほぼ1000になるように、菌体の近傍を測定した。光強度の変動は統計的なゆらぎの範囲内に収まっている。

3.3.2 測定結果

3.3.2.1 野生株のべん毛モーター

最初に、野生型のべん毛モーターの回転特性を調べた。図11（青線）は室温で測定した SJW3076 のレーザー暗視野顕微鏡データの例である。光強度は周期的に変動しており、その波形はよくそろっていた。光強度変化のピーク位置を決め（図11赤）、これから長時間の平均のべん毛回転数ではなく、1回転ごとの回転数の変動を求めることができた（図12）。約3.3秒間の測定で、平均回転数 119rps、最大回転数 139rps、最小回転数 89rps、標準偏差 8.8rps（平均回転数の 7.3%）という結果が得られた。このような長時間のべん毛モーターの回転安定性は、テザードセル法でも指摘されている（Berg, 1974）。

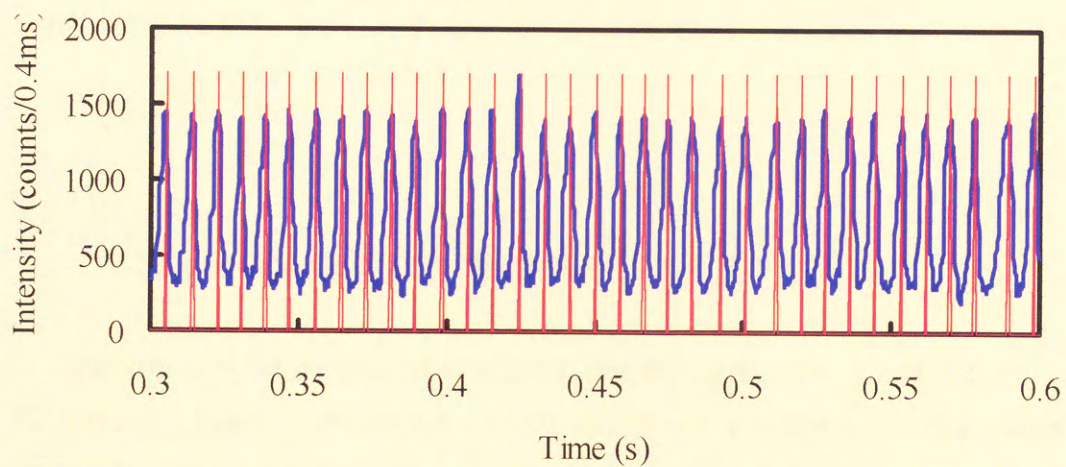
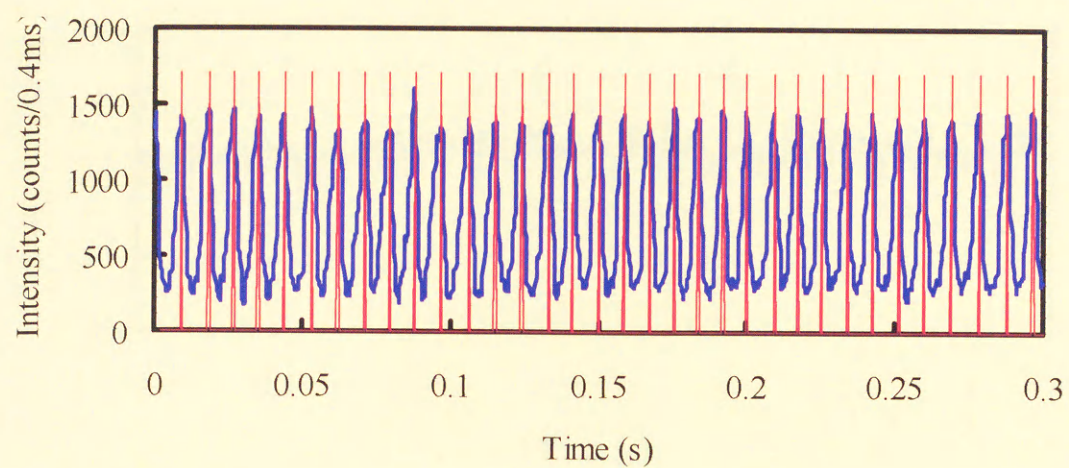


図11 SJW3076 のレーザー暗視野顕微鏡のデータ。

青線が室温で測定した光強度のデータである。赤線は光強度の変動のピーク位置を表している。

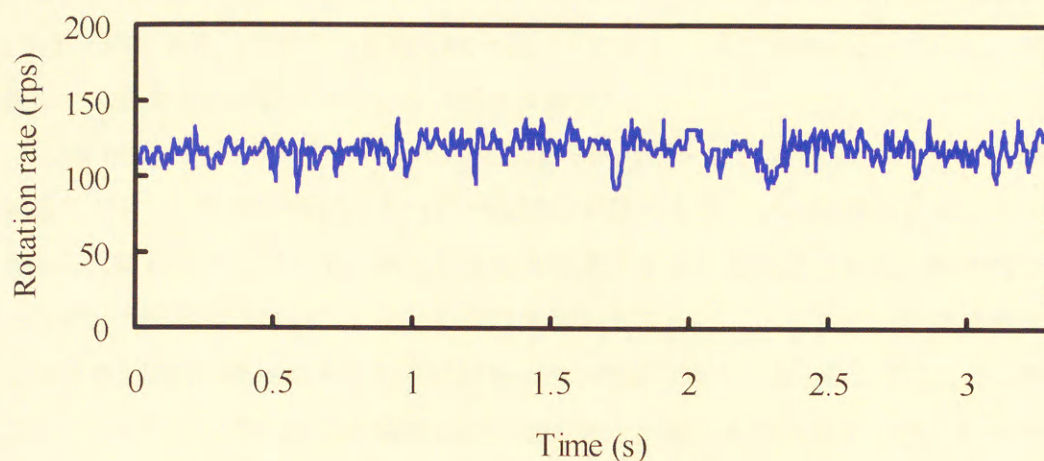


図12 SJW3076 のぺん毛回転数のデータ。
図 11 のピーク位置から計算したぺん毛回転数のデータである。

3.3.2.2 急激な回転数変化の発見

SJW3076 のぺん毛の回転は長時間で見れば比較的安定していると言えるが、1 回転ごとあるいは 1 回転以下の時間スケールで詳細にデータを検討すると、まれに急激に回転数に変動している場合があった。つまり、ぺん毛回転数のゆらぎはゆっくりと起こるもの以外に、一瞬にして別の回転数に飛ぶ場合があったのである。図 13 がその例である。赤矢印で示した時間に光強度の変化の立ち上がりがほかの周期に比べてなだらかになっているので、ぺん毛回転数がこの時間だけ遅くなったと考えられる。この時間のぺん毛回転数は約 40% だけ前後の周期よりも小さい。さらに立ち上がりの途中でごく短時間であるが強度がほぼ一定となっているので、ぺん毛は一瞬停止したのかもしれない。これらの変化は徐々に現れたものではなく、ゲートタイム (0.4ms) 数回の間に起こっていた。

この現象はレーザー暗視野顕微鏡によって生じる誤差 (図 10) では説明できないが、ぺん毛モーターに本来備わっている性質であるかどうかをこれだけで結論することもできない。そこで、ぺん毛モーターの部品であるスイッチ複合体に変異のあるぺん毛モーターでは、回転数の急激な変化がどの程度起こるのかを調べた。もしこの現象がぺん毛モーター固有の性質でなければ、野生型と突然変異体の間に回転数変動の程度やそ

の頻度には差がないであろうと考えたからである。使用した突然変異体はそのどれもが *che* 遺伝子群を欠失しており、遊泳方向を変えずにスムーズに遊泳する。ただし、スイッチ遺伝子の変異部位は異なっている（第6章参照）。

図14は、30°Cの SJW3076、Sw₈(Δ Che)、Sw₃₀(Δ Che)、Sw₄₉(Δ Che)のレーザー暗視野顕微鏡データと、それから読みとったべん毛回転数である。どの細菌株もスムーズに遊泳するにも関わらず、べん毛回転数の変動の程度はかなり差が見られた。野生株に比べて、スイッチ突然変異体のべん毛回転数は変動が大きかったが、スイッチ突然変異体どうしの間でも変動の程度に大きな違いがあった。数値で表すと表6のようになる。標準偏差で比べるよりも、最大値と最小値の間の差のほうが違いがはっきりした。もっとも回転数変動の大きかった Sw₃₀(Δ Che)では、最大値と最小値の間の差は平均値に対して94%に達した。一方、野生株 SJW3076 では56%であった。また、平均値と最小値の差は、一般的に平均値と最大値の差よりもかなり大きく、回転数変動は通常の回転から遅いほうへ起こっていると考えられる。

べん毛回転数の変動が激しい、Sw₃₀(Δ Che)の0.2秒から0.4秒までの時間のレーザー暗視野顕微鏡のデータを詳しく見ると、減速回転だけでなく、一時停止や逆回転が起こっていると考えられる（図15）。それらの境界ははっきりと判断できることから、野生株 SJW3076 の場合と同じく、回転数の変化は長くてもゲートタイム（0.4ms）二三回分の時間（約1ms）には終了している。また、通常回転から減速回転を経ずに、いきなり逆回転や一時停止に飛んでしまうことも珍しくなかった。

したがって、ここで観察されたべん毛の急激な回転数変動はべん毛モーター固有の性質であり、スイッチ複合体が密接に関係していると考えられた。

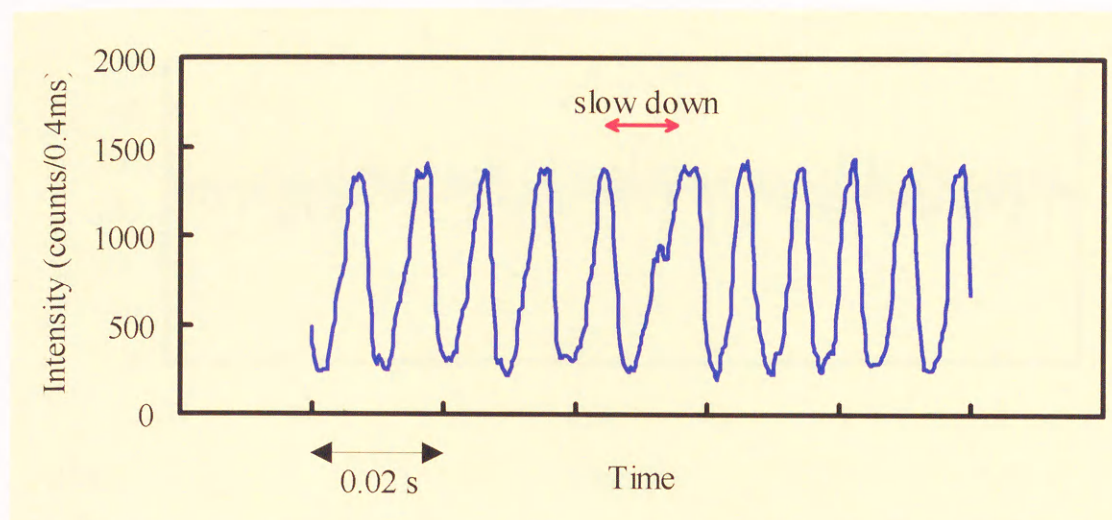
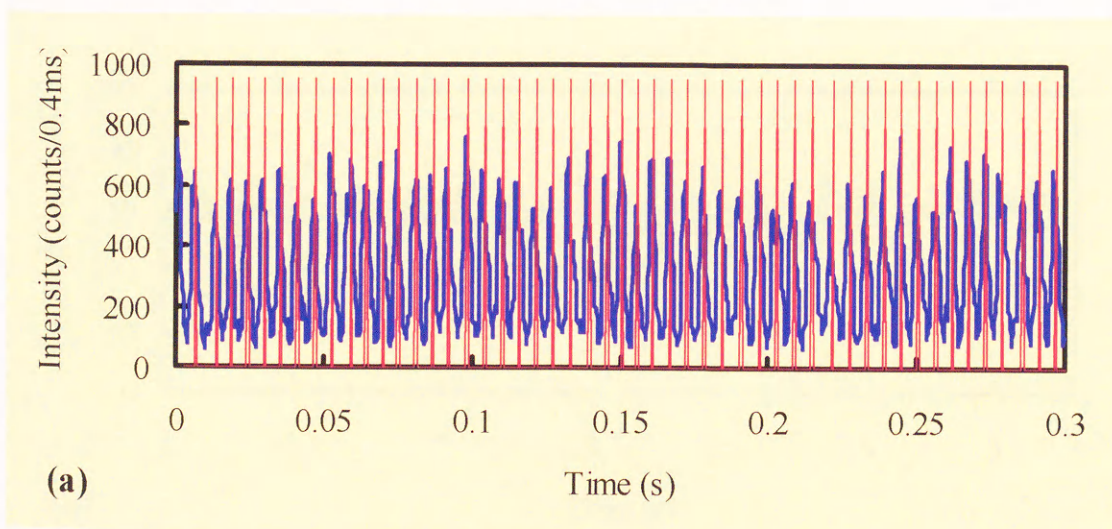
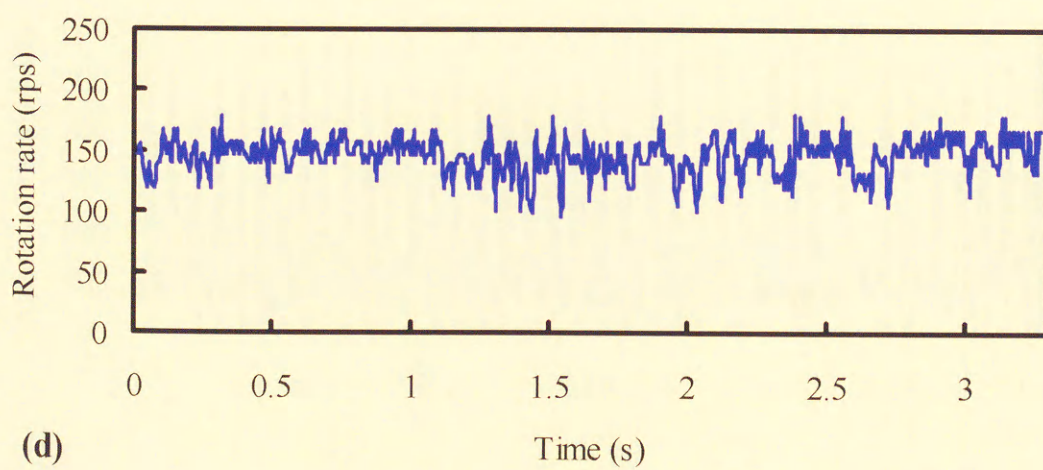
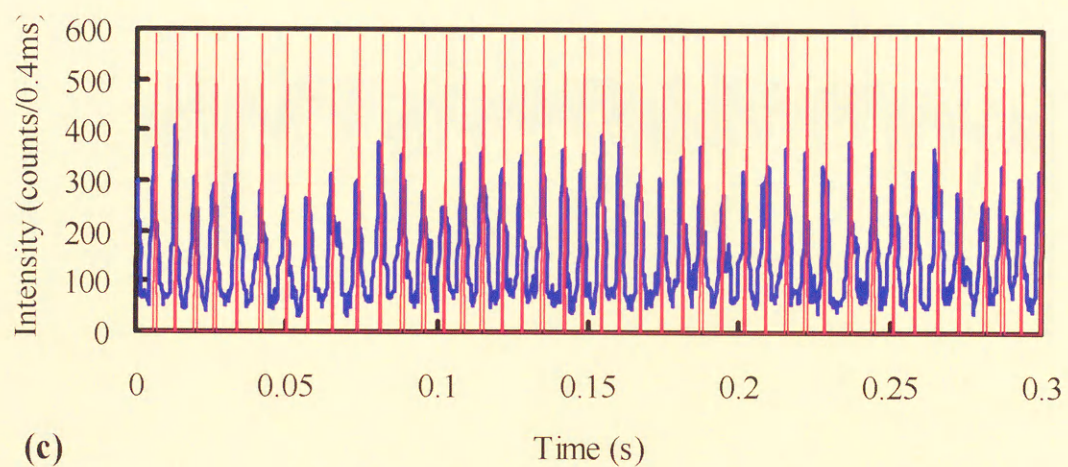
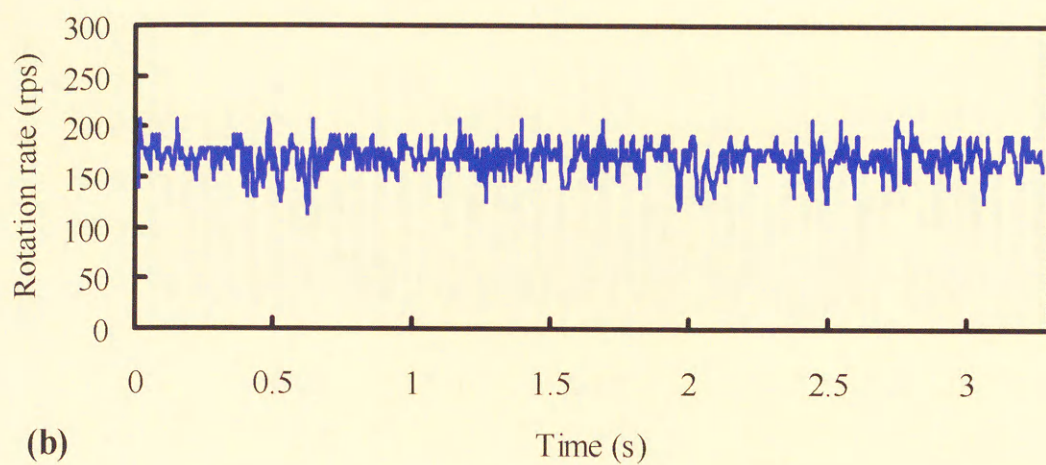
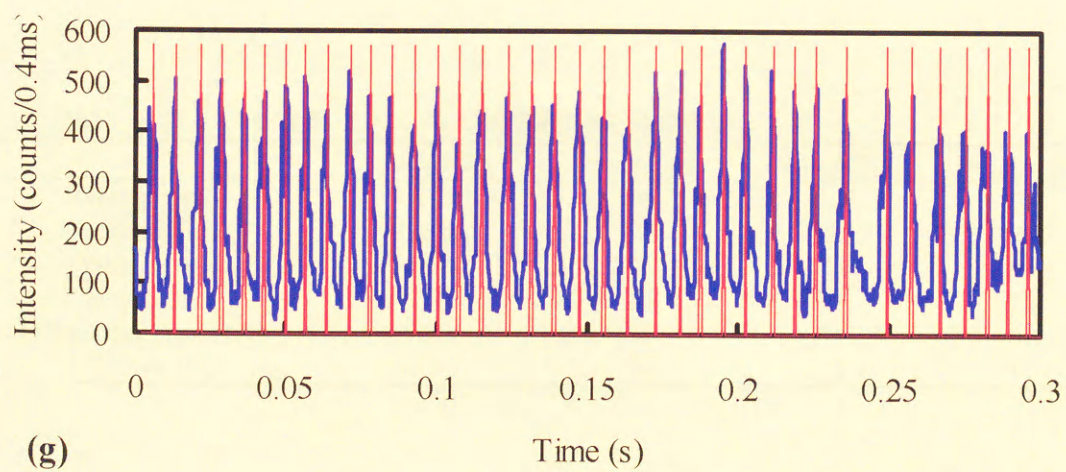
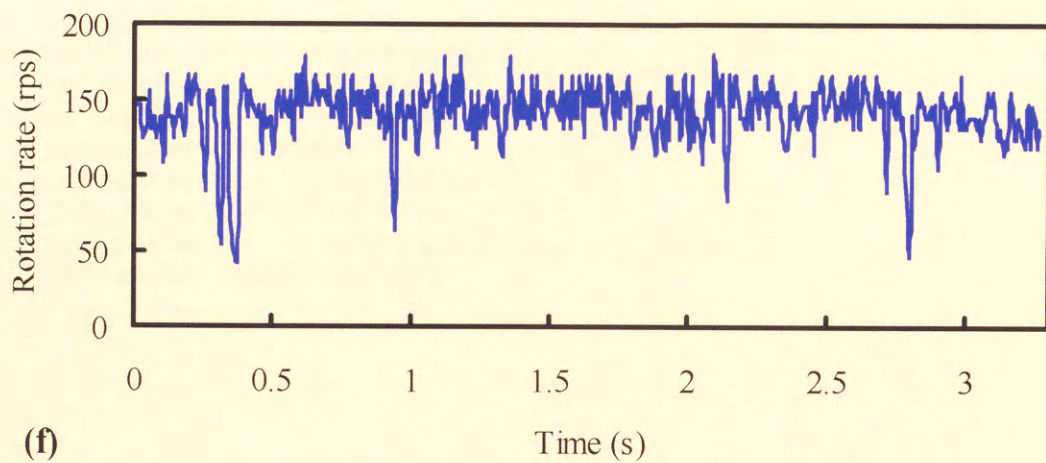
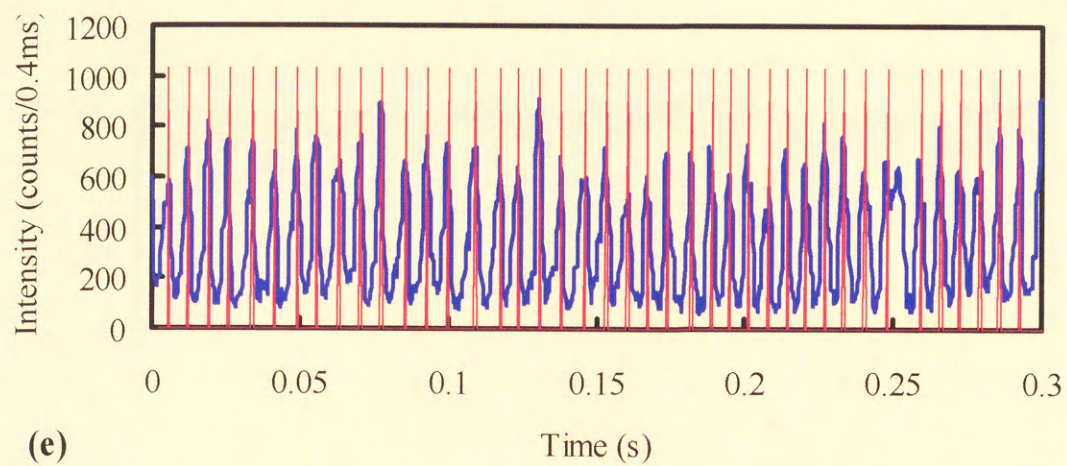


図13 SJW3076 のべん毛回転数の急激な変化。
赤矢印はべん毛回転が遅くなった時間を示している。







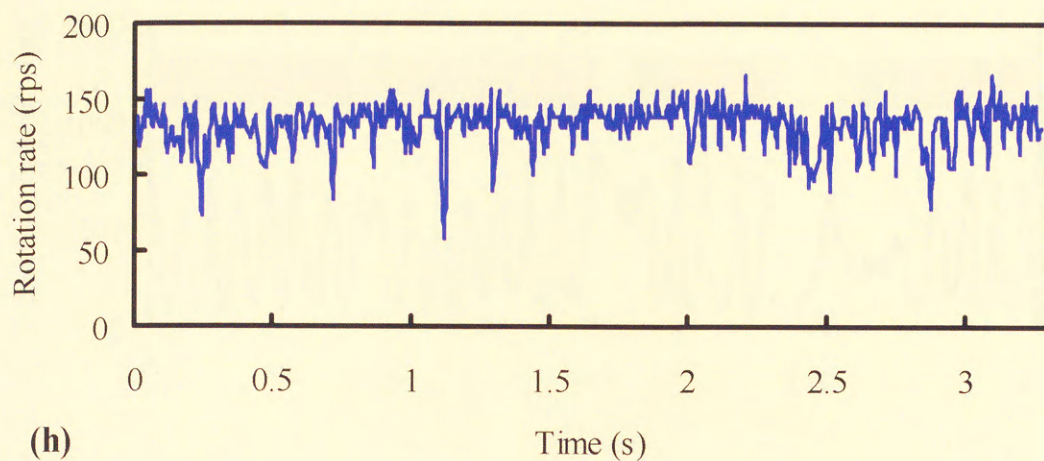


図14 スイッチ突然変異体のべん毛回転。

すべて 30°Cで測定した。

- (a) SJW3076 のレーザー暗視野顕微鏡データ。
- (b) SJW3076 のべん毛回転数の変化。
- (c) Sw₈(ΔChe)のレーザー暗視野顕微鏡データ。
- (d) Sw₈(ΔChe)のべん毛回転数の変化。
- (e) Sw₃₀(ΔChe)のレーザー暗視野顕微鏡データ。
- (f) Sw₃₀(ΔChe)のべん毛回転数の変化。
- (g) Sw₄₉(ΔChe)のレーザー暗視野顕微鏡データ。
- (h) Sw₄₉(ΔChe)のべん毛回転数の変化。

表6 スイッチ変異によるべん毛回転数変動の違い。

	SJW3076	Sw ₈ (ΔChe)	Sw ₃₀ (ΔChe)	Sw ₄₉ (ΔChe)
Average (rps)	171	147	144	134
Maximum (rps)	208	179	179	167
Minimum (rps)	114	96	43	58
S.D. (rps)	16	15	17	14
(Max.-Min.)/Ave. (%)	56	56	94	81
S.D./Ave. (%)	9	10	12	11

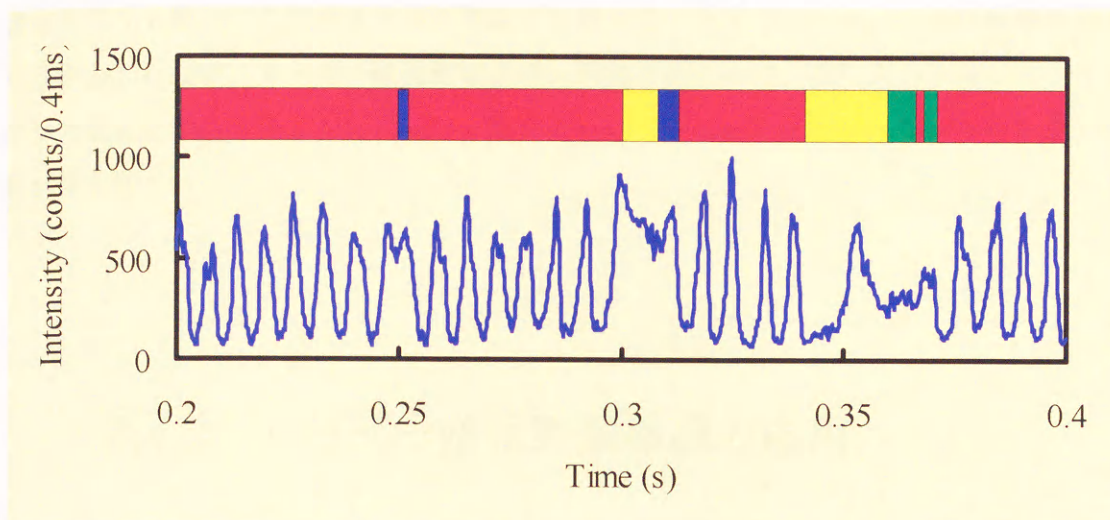


図15 $Sw_{30}(\Delta Che)$ のレーザー暗視野顕微鏡データ。
青線はレーザー暗視野顕微鏡データ、その上の帯の色分けは推定された回転数変動の分類を示す。赤が通常回転、黄色が減速回転、緑が停止、青が逆回転を表す。

3.4 考察

3.4.1 ベン毛モーターのトルク発生機構

レーザー暗視野顕微鏡によりベン毛1本の回転を十分高い時間分解能で測定できるようになったために、ベン毛の回転数がある値から別の値へ急激に変化するという現象を発見することができた。この結果は、ベン毛モーターの発生トルクが連続的な値をとることができず、ベン毛モーターがいくつかの固有の発生トルクのモードを持っていて切り替えているというモデルを示唆している。そして、この切り替えにはスイッチ複合体が深く関係しているらしく、それに変異のある突然変異体は、スムーズな遊泳パターンを示していたとしても、レーザー暗視野顕微鏡による測定結果は野生株よりも回転数変動が大きかった。

水素イオンに関する電気化学的ポテンシャル差（ベン毛モーターの入力エネルギー）を一定に保っておいて、トルク発生に関係していると考えられている、スイッチ複

合体やモット複合体の突然変異体の挙動を比較することができれば、さらに情報が得られるかもしれない。レーザー暗視野顕微鏡が開発されたので、次に入力エネルギー（イオンの電気化学的ポテンシャル差とイオン流）について計測あるいは制御する手法の開発が望まれている。

3.4.2 レーザー暗視野顕微鏡の応用

本章の研究で開発したレーザー暗視野顕微鏡は、本研究の以下のふたつの章で述べる細菌運動の力学の解析に用いられた。さらに、べん毛モーターの回転をさまざまな方法で遅くしたときのゆらぎの解析をおこなった研究（Muramoto et al., 1995; Muramoto et al., 1996）や、イオンチャネルの研究で使われるパッチクランプ法を応用してべん毛モーターに電気ポテンシャルを印可した実験（Kami-ike et al., 1991）にも応用された。今後も、単一のべん毛モーターの回転を高い時間分解能で測定できるという特長を生かして、べん毛モーターのエネルギー変換機構の解明のためにレーザー暗視野顕微鏡が使われるだろう。

3.5 まとめ

本章では、べん毛1本の回転計測を高時間分解能で実現した「レーザー暗視野顕微鏡」法の開発を紹介し、この方法で初めて発見することのできた、べん毛回転数の急激な変化について述べた。スイッチ複合体が関与している可能性が高いという点で、この回転数の変化は、第6章で述べるべん毛モーターの回転方向のスイッチング機構と関係があるのかもしれない。ここで開発したレーザー暗視野顕微鏡は、細菌のべん毛モーター研究の発展に貢献できる手法である。

4 単べん毛細菌の運動解析

第3章ではべん毛の回転数を高時間分解能で測定できる手法「レーザー暗視野顕微鏡」を開発し、べん毛モーターの瞬時の回転数変動を発見した。本章では、レーザー暗視野顕微鏡を応用して、もっとも単純なべん毛型の細菌、つまり単べん毛細菌のべん毛回転数と遊泳速度を同時に測定することによって、細菌が生活する微小世界の力学について調べる。

4.1 背景と目的

4.1.1 微小世界の流体力学

微小世界の力学を調べるために、細菌の運動を解析することはひとつの有効な手段である。流体力学の基本方程式がすでに確立されているとはいっても、それを実際の場面（例えば、細菌の運動）に適用するには、複雑な境界条件を含んだ流れの場を考慮しなければいけない点、基本方程式が非線形方程式である点、などから、厳密に解を求めることはきわめて困難である。したがって、細菌の運動の解析の方法は、実際の細菌運動の測定結果を、どのような近似や仮定を前提としたモデルによって説明できるかを検証することになる。細菌の運動、ひいては微小世界において、どのような近似が許されるのかを確認することが、本章の目的である。

モデルの妥当性を検証するためには、考慮する運動のパラメーターがひとつだけでは不十分である。例えば、細菌の遊泳速度だけを考慮するならば、おそらくどのよう

なモデルでもべん毛モーターの発生トルクを適当に仮定することによって、実験値と合わせる事が可能であろう。したがって、ふたつ以上の運動のパラメーターを同時に測定し、その関係を矛盾なく定量的にも説明できるモデルが必要とされる。本章ではふたつのパラメーターとして、細菌の遊泳速度のほかにべん毛の回転数を選んだ。なぜならば、第3章で述べたように、時々刻々の高速のべん毛回転数をレーザー暗視野顕微鏡によって測定できるからである。もしも、速いべん毛回転の測定ができなければ、何らかの方法でべん毛回転数を落とさなければならず、そのために流体力学的な環境に影響を与えることは避けられない。おそらく、別の運動のパラメーターを選ぶか、あえて影響を受けた状態の環境に甘んじるか、ということになるだろう。

さらに、単純な試料を用いることも、解析には重要である。力学的にもっとも単純な細菌の形態は、菌体の極にべん毛が1本だけ生えている単べん毛型である。*Pseudomonas* などが単べん毛型の細菌として知られている。単べん毛細菌ならば菌体とべん毛1本の流体中での運動を考えればよいので、複数のべん毛を持つ細菌よりも考慮しなければならない因子の数がずっと少ない。本章では海洋性 *Vibrio* の一種である、*Vibrio alginolyticus* を実験材料として選択した。

以上のように、高速のべん毛回転数を測定できるレーザー暗視野顕微鏡と単純な単べん毛細菌 *V. alginolyticus* を使うことによって、モデル中で考慮しなければならない因子の数を減らすことができる。この2点を準備できたために、本章の研究を実施できるようになったと言える。

4.1.2 ベん毛モーターの特性解析

微小世界の力学が明らかになってくれば、べん毛モーターをはじめ、運動する生体分子機械の特性解析がより正確にできるようになる。微小世界の力学がどのようにべん毛モーターの特性解析に関わってくるかを以下に説明する。

べん毛モーターのトルク発生機構を解明するためのひとつの方法は、そのトルク特性を解析することである。代表的な人工の電磁式モーターとして、直流モーター、誘導モーター、同期モーターがあげられるが、そのトルク-回転数特性はそれぞれ異なる

(図 16)。トルク発生機構の違いをトルク－回転数特性がよく表している例である。べん毛モーターのトルク発生機構の解明にも、トルク特性のデータはたいへん重要である。

回転中のべん毛モーターの発生トルクを直接測定する手段はない。しかし、幸いなことに、バクテリアの世界の運動は通常の時間分解能 (ms 程度) の測定をしている限り定常状態であり、流体から受ける粘性抵抗力はその速度に比例すると考えてよい。したがって、べん毛モーターの負荷がべん毛である場合、その発生トルクはべん毛の粘性抵抗トルクと等しいので、べん毛の回転数を測定し、その値に粘性抵抗係数をかければ、原理的には発生トルクを求めることができる。ところが、単純な実験系であるスタックセル (図 17) を考えても、菌体やガラス表面の影響、べん毛回転軸のずれの影響を考慮するとなると、複雑すぎて粘性抵抗係数をどうすればよいのかわからないし、あるいは単純に回転数と粘性抵抗トルクが比例するのかさえ判断できない。つまり、単純な形状の物体の運動ならば、問題なく粘性抵抗力を求められるとしても、細菌のように少し複雑な形状になると、すべての影響を考慮することは実際の場面では不可能であると言わざるを得ない。本章のもうひとつの目的は、トルク特性を求めるような実際の場面で使える単純なモデルを提案することである。

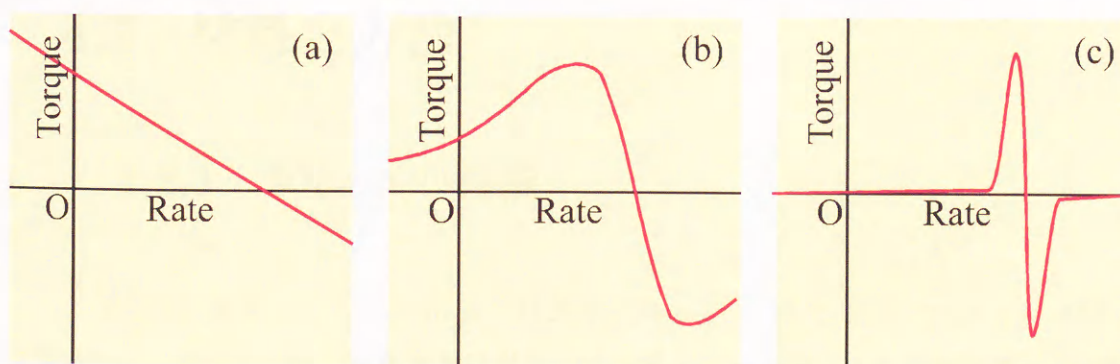


図16 代表的な人工の電磁式モーターのトルク－回転数特性。

- (a) 定電圧駆動したときの直流モーターの場合。モーター回転数が上がると、誘起電圧によりコイルに流れる電流が減るために、トルクが減少する。
- (b) 定周波数駆動したときの誘導モーターの場合。最大トルクは駆動周波数よりも少し低い周波数で発生する。
- (c) 定周波数駆動したときの同期モーターの場合。駆動周波数近くのごく狭い範囲でしかトルクを発生しない。

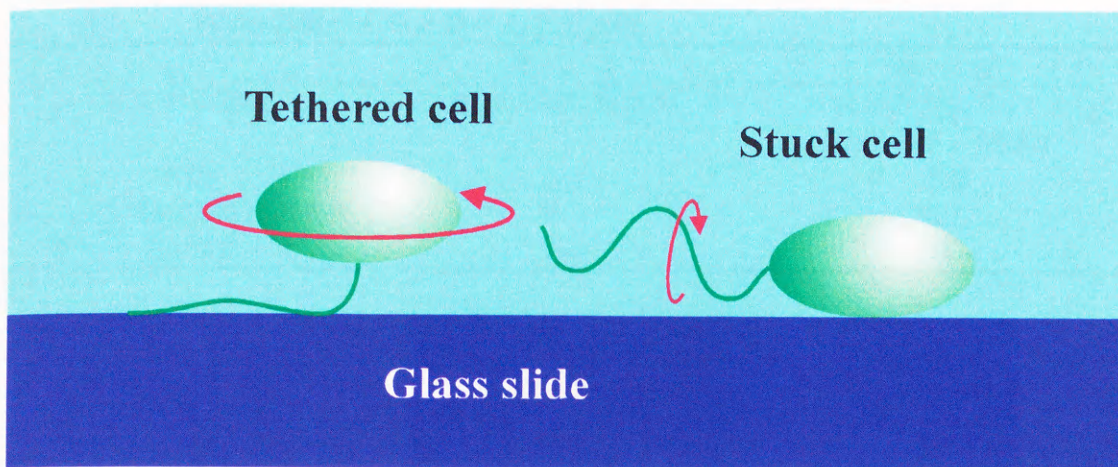


図17 テザードセルとスタックセル。

左図：テザードセルの模式図。べん毛がガラスに固定されているので、べん毛モーターのトルクによって菌体が回転する。菌体は通常の位相差顕微鏡などで簡単に観察できるため、べん毛モーターが回転していることの直接的な証明に使われた（Silverman and Simon, 1974）。

右図：スタックセルの模式図。菌体をガラスに固定し、べん毛モーターの負荷をべん毛としている。そのため、遊泳中の状態に近い速いべん毛回転を観察することができる。レーザー暗視野顕微鏡の試料として採用された。

4.2 材料と方法

4.2.1 *Vibrio* の特徴

本実験で使用した *V. alginolyticus* は海洋性 *Vibrio* の一種で、液体中では1本の極べん毛によって遊泳するが、固体表面に付着すると周べん毛を使って表面を這うような動きをする（Shinoda and Okamoto, 1977）。極べん毛は外膜が鞘のように覆っているのに対して、周べん毛はべん毛タンパク質がむき出しのままである。さらに、極べん毛のべん毛モーターは Na^+ イオン、周べん毛のべん毛モーターは H^+ イオンを駆動源としており、モーターの種類まで異なっている（Hirota and Imae, 1983）。

表7 *Vibrio* の極べん毛と周べん毛の比較。

	極べん毛	周べん毛
発現する環境	粘度の低い液体中	固体表面あるいは粘度の高い液体中
本数	1 本	多数
鞘（べん毛の皮膜）の有無	あり	なし
モーターの駆動イオン	Na^+	H^+

4.2.2 スムーズ突然変異体 YM42

野生株の *V. alginolyticus* は、自発的にランダムに前進と後退を繰り返す（図 18）。この前進と後退の時間の割合を調節することによって、走化性が実現されている。本章の実験にとってこの性質は邪魔なので、前進しかしない突然変異体（スムーズ突然変異体）を使うことにした。さらに、極べん毛しか生えない性質を併せ持つものを選んだ。この菌株 YM42 は、名古屋大学今栄研究室で前川氏が単離したものである（図 19）。

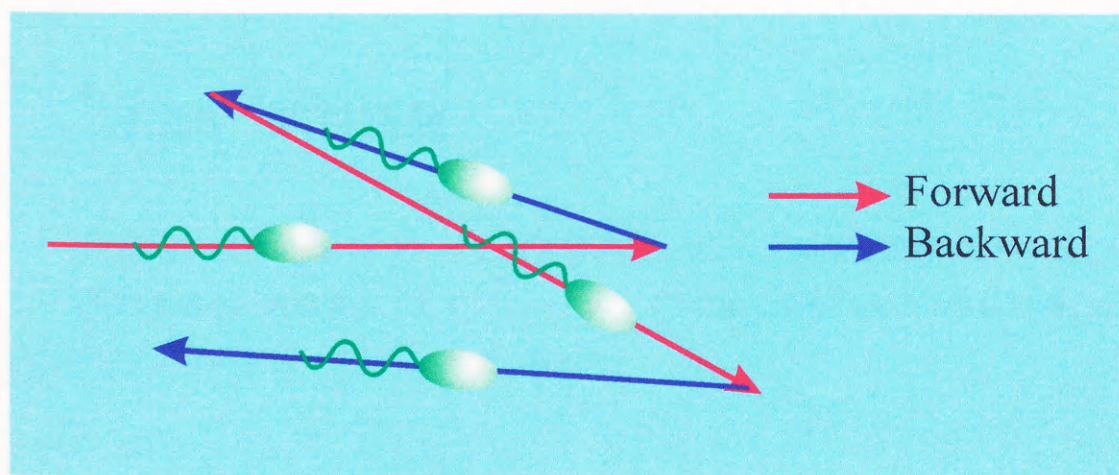


図18 *V. alginolyticus* の運動。

野生株の *V. alginolyticus* は、べん毛が菌体を押して前進するモードと、引っ張って後退するモードを交互に繰り返す。各モードの持続時間は一定していないが、その割合を調節することによって走化性が実現されている。



図19 *V. alginolyticus* YM42 の電子顕微鏡像。
YM42 は極べん毛しか生えず、かつ前進しかしない突然変異体である。

4.2.3 試料調製

細菌は、液体培地（表 8）中で 37℃ で浸透培養した。対数増殖期の後期に遠心によって細菌を集め、観察溶液（表 8）に 1ml あたり 10^8 個の密度になるように懸濁した。試料は 25℃ に 1 時間置いてから、測定に使った。

表8 *V. alginolyticus* の液体培地と観察溶液の組成。

組成	
液体培地	2.5% heart infusion broth (Difco Lab.), 1.5% NaCl
観察溶液	50 mM HEPES-KOH (pH 7.0), 5 mM glucose, 5 mM MgCl ₂ , 300 mM NaCl

4.2.4 ベン毛回転数と遊泳速度の測定

個々の細菌のベン毛回転数と遊泳速度は、25°C、30°C、35°Cでレーザー暗視野顕微鏡を使って同時に測定した。顕微鏡試料は、まず細胞懸濁液を一滴スライドガラスに置き、カバーガラスをかけ、その周囲をシリコンオイルでシールしたものを使った。シールの目的は、懸濁液が流れないようにするためである。また、温度変化による影響を防ぐために、スライドガラスとカバーガラスはあらかじめ測定温度になじませておいた。ベン毛回転数はレーザー暗視野顕微鏡の信号変化の周期から求めた（第3章、本章結果参照）。遊泳速度は、同時に記録したビデオ画像から細菌が1秒間に移動した距離を測定し、求めた。すべての測定は細菌を遠心で集めてから2時間以内に終了するようにした。

4.2.5 菌体とベン毛の形状の測定

菌体とベン毛の形状のパラメーターは、透過型電子顕微鏡（JEM 1200EXII、日本電子）で測定した。電子顕微鏡試料は、前項 5.2.4 で調製したものをリン酸タングステン酸（pH7.4）を用いてネガティブ染色したものを使い、それを写真に撮った。測定したパラメーターは、細胞の長さ（ $2b$ ）、細胞の半径（ $2a$ ）、ベン毛繊維の長さ（ L ）、ベン毛繊維の半径（ r ）、ベン毛らせんのピッチ（ p ）、ベン毛らせんのピッチ当たりの繊維の長さ（ l ）、である。ベン毛らせんの半径（ r ）は数式 28により求めた。

数式28

$$r = \frac{\sqrt{l^2 - p^2}}{2\pi}$$

4.3 結果

4.3.1 遊泳速度とべん毛回転数の同時測定

遊泳速度とべん毛回転数をレーザー暗視野顕微鏡を使って同時に測定した。レーザー暗視野顕微鏡は元々はスタックセルのべん毛回転数を測定するために開発された方法だが、遊泳する細菌にも応用することができた。つまり、偶然スリットの位置を通過する細菌の遊泳速度とべん毛回転数を測定するという方法（図 20）で、思ったよりも確率高く成功した。実際の実験では、散乱光強度とビデオ画像は連続して記録しておき、細菌がスリットを通過したときのデータを抽出した。このとき細菌がスリットに対して約 30 度以上傾いて遊泳してきたものは除外した。べん毛の軸に対してレーザー光の照射角度が 45 度に近いときはべん毛らせんのピッチ当たりひとつの大きな散乱光強度変化が生じるが、そうでないと強度変化が小さくなり、さらに直角に近くなるとふたつの強度変化が生じてしまうからである。

図 21 は *V. alginolyticus* のレーザー暗視野顕微鏡データの例である。菌体がスリットを通過すると大きな信号が観測され、続いて、べん毛に対応するやや小さな信号が見られた。時間軸を拡大してべん毛に対応する信号を詳しく観察すると、明らかに周期的な光強度変化が認められた。強度変化の 1 周期は、べん毛らせんの位相がスリット上で 1 回転分動いたことを表している。そこで、平均のピーク間隔から見かけのべん毛回転数 (f_{app} ; 単位 rps) を求めた。さらに、見かけのべん毛回転数から細菌が遊泳しているぶんを次のように補正することによって、真のべん毛回転数 (f ; 単位 rps) を求めた。

$$\text{数式 29} \quad f = f_{app} + \frac{v}{p}$$

ただし、 v は遊泳速度、 p はべん毛らせんのピッチである。なお、同一の細菌の遊泳速度は記録したビデオ画像から求めた。

べん毛の通過に対応する期間のはじめの部分の信号は、中心付近に比べて小さいことが多かった。遊泳中の細菌を暗視野顕微鏡で観察すると、べん毛の根元のほうは先のほうよりもやや暗かった。これらの現象は、べん毛の根元の部分がほかの部分とは異なる動作をしている（例えば、変形している）ことを示しているように見える。

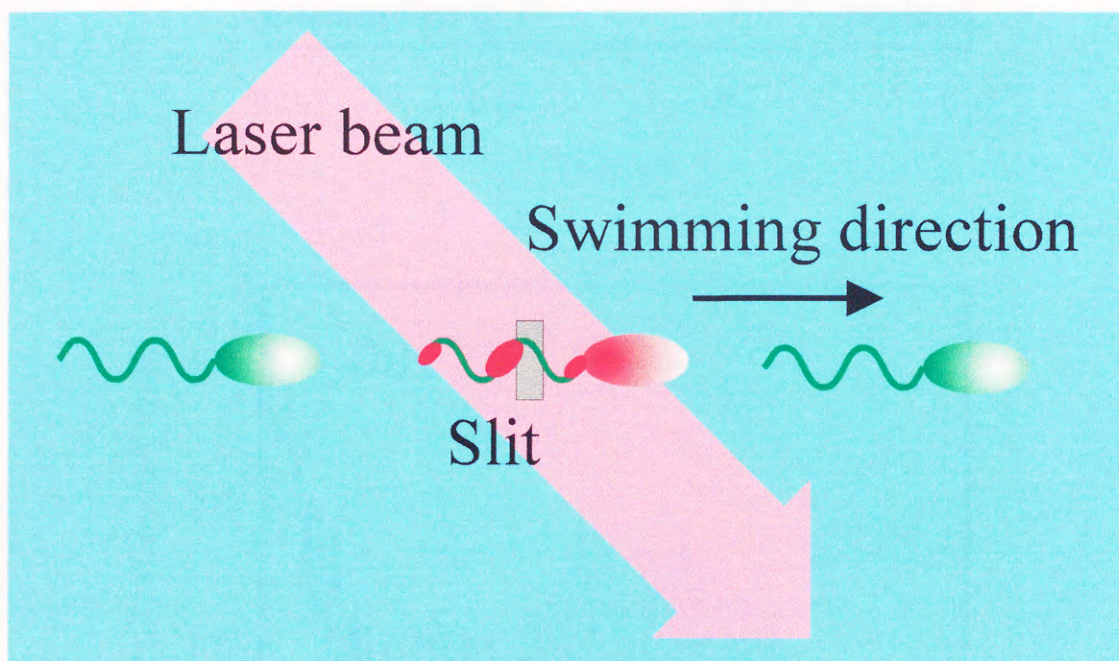


図20 遊泳する細菌のべん毛回転数を測定する方法。

レーザー暗視野顕微鏡のスリット面（結像面）を示してある。ただし、わかりやすいように対応する試料面のレーザー光の位置も示した。細菌の像が左から右（あるいは右から左）へ向かってスリットを通過するときにべん毛回転数の測定ができる。ただし、遊泳方向が図の水平軸から30度以上傾斜しているものは除いた。この図からわかるように、最初に菌体に対応する信号が得られ、その後べん毛に対応する信号が続く。

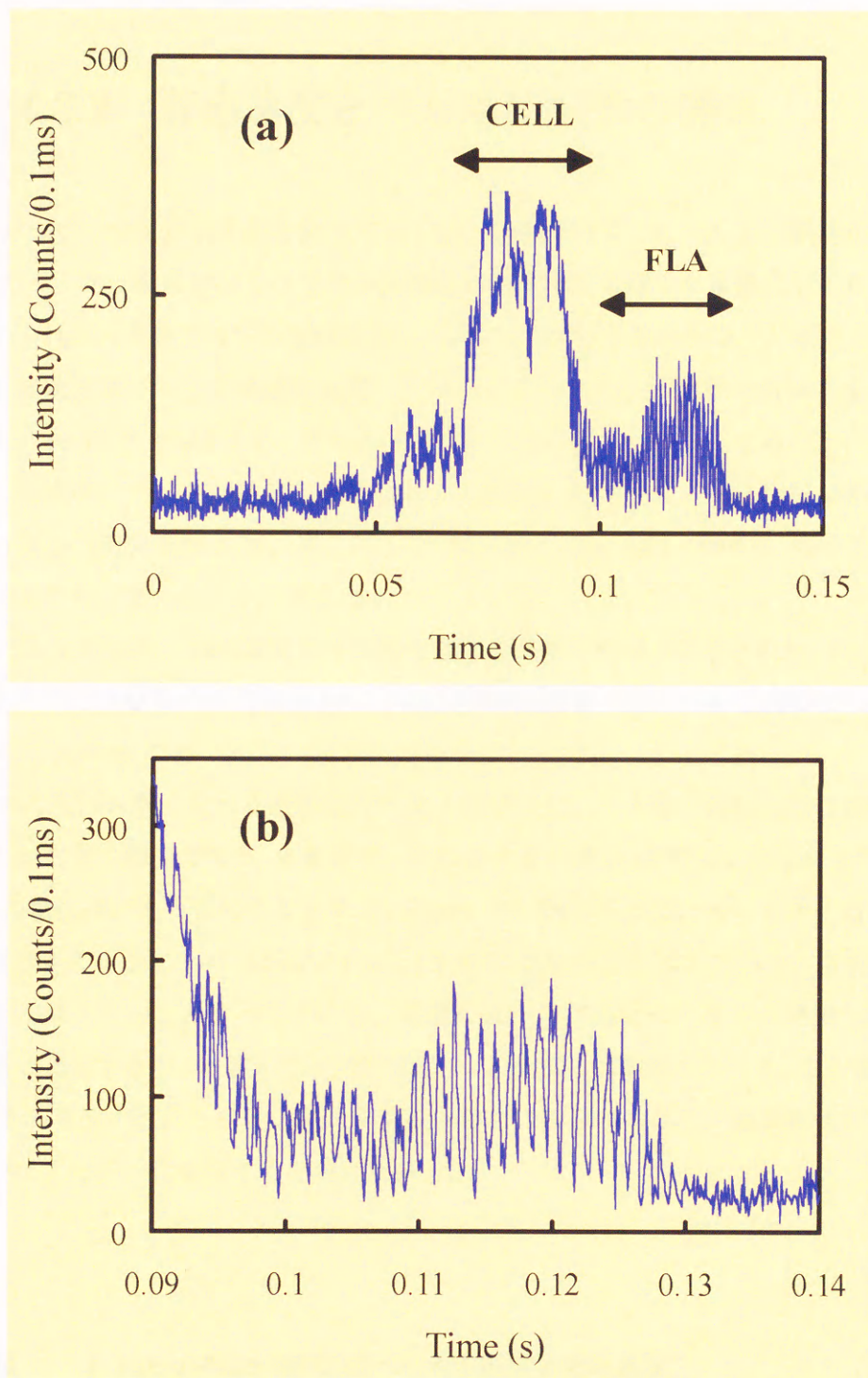


図21 *V. alginolyticus* YM42 のレーザー暗視野顕微鏡データの例。
 レーザー暗視野顕微鏡のスリットを通過した光強度の時間変化。
 (a) CELL と示された時間には菌体の像がスリットを通過し、FLA ではべん毛が通過した。
 CELL 直後の FLA 部分の信号はそのあとの信号よりもやや小さい。
 (b) FLA の部分をさらに詳細に見るために拡大した図。はっきりと周期的な変動が見られる。

4.3.2 遊泳速度とべん毛回転数の関係

レーザー暗視野顕微鏡を使って 25、30、35℃で測定したべん毛回転数と遊泳速度を図 22に示した。温度が高くなるほど回転数も遊泳速度も速くなる傾向があり、正の相関が認められた（全体で相関係数は 0.95）。ただし、ばらつきがかなり大きく、べん毛回転の速い細菌が必ずしも遊泳速度も速いとは限らなかった。回転数と遊泳速度の測定誤差はそれぞれ 3%と 4%なので、それ以外の要因がこのばらつきをもたらしていると考えられる。温度別にデータを見ると（図 22b）、回転数と遊泳速度の間に相関があるとは認めにくくなる（相関係数は 25、30、35℃でそれぞれ 0.61、0.51、0.60）。強いて言えば、上に凸の分布をしているように見える。

べん毛回転数と遊泳速度の平均値や標準偏差などを表 9にまとめた。25、30、35℃におけるべん毛回転数の平均値は 690、910、1050rps であった。べん毛回転数の最高記録は、35℃で 1660rps であった。

べん毛回転数に対する遊泳速度の比（v/f 値）は、べん毛 1 回転当たり細菌がどれだけ進むかを表す指標である。全測定データに対する平均の v/f 値は 0.113μm であった（表 10）。この値はべん毛らせんのピッチ（1.58μm）の 7%であった。もしコルクの中を進むコルク栓抜きのようにすべりがなければ、v/f 値は 100%になるはずなので、測定結果はかなりすべりが大きいことを示している。温度によってべん毛モーターの発生トルクや溶液の粘度は変化するが、測定した v/f 値はほとんど温度には関係なかった。この結果から、v/f 値はべん毛モーターの発生トルクや溶液の粘度の関数ではなく、温度変化には無関係な別のパラメーターに依存すると考えられる。

表9 *V. alginolyticus* YM42 のべん毛回転数と遊泳速度。

温度 (℃)	べん毛回転数 (rps)				遊泳速度 (μm/s)			
	平均値	標準偏差	最大値	最小値	平均値	標準偏差	最大値	最小値
全体	920	250	1660	290	100	24	147	48
25	690	160	950	290	77	17	116	48
30	910	190	1300	510	100	17	140	63
35	1050	240	1660	560	116	19	147	75

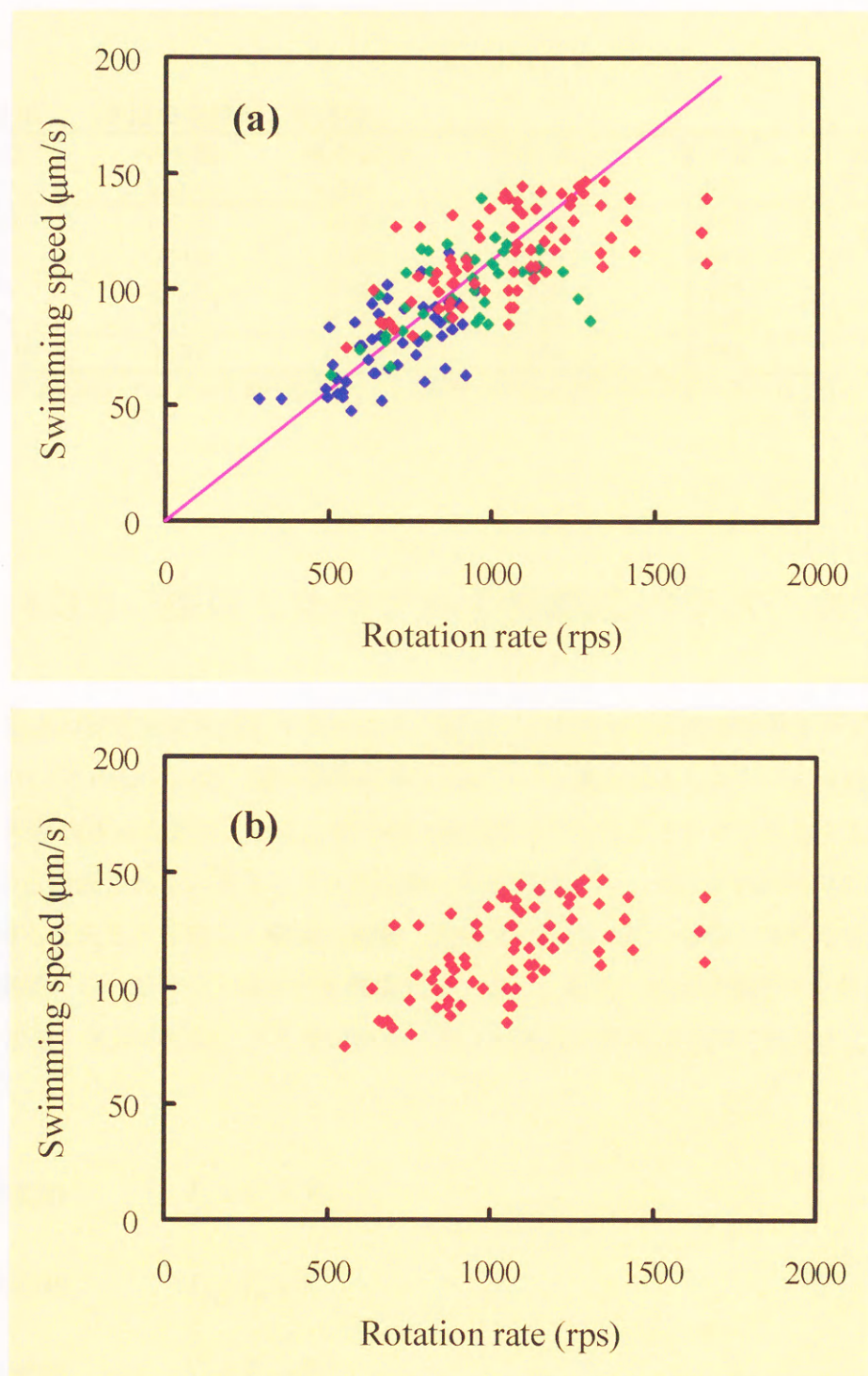


図22 *V. alginolyticus* YM42 のべん毛回転数と遊泳速度の関係。
 それぞれの点が個々の細菌に対するデータを表す。
 (a) 25、30、35°Cすべての温度の測定データを示している。実線は回転数に対する遊泳速度の比の平均値を表す。
 (b) 35°Cのデータだけを示す。

表10 v/f 値の実験値と計算値。

温度 (°C)	平均値 (μm)	標準偏差 (μm)	最大値 (μm)	最小値 (μm)	試料数
全体	0.113	0.021	0.186	0.067	167
25	0.114	0.024	0.186	0.067	47
30	0.112	0.019	0.150	0.067	42
35	0.113	0.020	0.180	0.068	78
計算値	0.137	0.019	0.164	0.074	111

計算値は図 23 のモデルと電子顕微鏡による細菌の形態測定の実験データから得られたもの。

4.3.3 採用したモデルと形態のパラメーター

前述の測定結果を解析するために、遊泳する細菌を表す簡単な力学モデルを考え
た (図 23)。このモデルは、遅い粘性流体 (レイノルズ数が小さくストークス近似が成り
立つ)、回転楕円体の菌体、らせん形の細い繊維状のべん毛とトルクを発生するべん毛モ
ーターから構成される。菌体とべん毛に働く粘性抵抗力は、それぞれが独立に存在する
ときと同じであると仮定し、壁面の影響、菌体とべん毛の間の流体力学的な相互作用、
ほかの細菌からの影響などはすべて無視した。また、運動は定常状態だけを考えた。

並進、菌体の回転、べん毛の回転に関する運動方程式はそれぞれ次のように表さ
れる。

$$\text{数式30} \quad F_c + F_f = 0$$

$$\text{数式31} \quad T_c - T_m = 0$$

$$\text{数式32} \quad T_f + T_m = 0$$

ただし、 F_c と F_f は菌体とべん毛に働く粘性抵抗力、 T_c と T_f は菌体とべん毛に働く粘性抵
抗トルク、 T_m はべん毛モーターが発生するトルクである。

菌体を回転楕円体に近似して考えているので、菌体に働く粘性抵抗力、粘性抵抗
トルクは次のように展開される。

$$\text{数式33} \quad F_c = \alpha_c v$$

$$\text{数式34} \quad T_c = \beta_c \omega_c$$

$$\text{数式35} \quad \alpha_c = -6\pi\mu a \left\{1 - \frac{1}{5}\left(1 - \frac{b}{a}\right)\right\}$$

$$\text{数式36} \quad \beta_c = -8\pi\mu a^3 \left\{1 - \frac{3}{5}\left(1 - \frac{b}{a}\right)\right\}$$

ただし、 v と ω_c は遊泳速度と菌体の回転数、 α_c と β_c は粘性抵抗係数、 μ は溶液の粘度、 a と b は菌体（回転楕円体）の短半径と長半径である。数式は球に近い回転楕円体に対する近似式であるが、 b が a の5倍までならば誤差は無視できるほど小さい（Happel and Brenner, 1973）。

べん毛に働く粘性抵抗力と粘性抵抗トルクは、次のように展開される。

$$\text{数式37} \quad F_f = \alpha_f v + \gamma_f \omega_f$$

$$\text{数式38} \quad T_f = \gamma_f v + \beta_f \omega_f$$

$$\text{数式39} \quad \alpha_f = -(8\pi^2 r^2 + p^2) C_0$$

$$\text{数式40} \quad \beta_f = -(4\pi^2 r^2 + 2p^2) r^2 C_0$$

$$\text{数式41} \quad \gamma_f = 2\pi r^2 p C_0$$

$$\text{数式42} \quad C_0 = \frac{-2\pi\mu L}{\left(\log \frac{d}{2p} + \frac{1}{2}\right)(4\pi^2 r^2 + p^2)}$$

ただし、 ω_f はべん毛の回転数、 α_f と β_f と γ_f は粘性抵抗係数、 r と p と d と L はそれぞれべん毛らせんの半径とピッチ、べん毛繊維の半径と長さである。数式37から数式42は Holwill and Burge (1963) の式を変形したものである。

計算に必要な菌体とべん毛の形態のパラメーター（図 24）は、細菌をネガティブ染色して透過型電子顕微鏡を使って測定した（表 11）。菌体の長さとべん毛繊維の長さに関しては標準偏差が平均値の 25%と大きく、そのほかのパラメーターに関しては 10%程度であった。この結果から菌体とべん毛の長さは細菌ごとに違うが、そのほかのパラメーターは細菌ごとに変化しないと考え、後者のパラメーターは計算には平均値を使うことにした。菌体とべん毛の長さは個々の値を使ったが、両者の間に相関は見られなかった（図 25；相関係数は 0.21）。レーザー暗視野顕微鏡測定の前後の試料の間で、菌体とべん毛の長さの平均値や標準偏差はほとんど違いがなかった。したがって、測定中にパラメーターの値は変わらないと考えてよい。

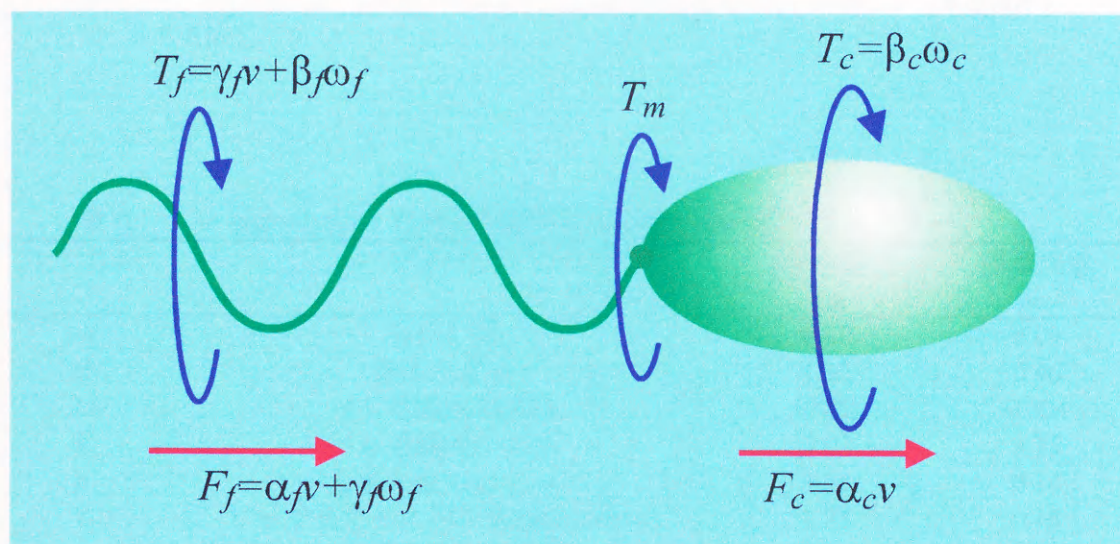


図23 細菌の運動を解析するために採用したモデルの模式図。

回転楕円体の菌体、らせん形の細い繊維状のべん毛、菌体とべん毛を接続しトルクを発生するべん毛モーターから構成される。菌体とべん毛にはべん毛モーターが発生するトルク (T_m) のほかに、流体から受ける粘性抵抗 (F_c, F_f)、粘性抵抗トルク (T_c, T_f) が作用する。 v, ω_c, ω_f は遊泳速度、菌体の回転数、べん毛の回転数であり、 $\alpha_c, \beta_c, \alpha_f, \beta_f, \gamma_f$ は粘性抵抗係数である。それぞれの粘性抵抗は菌体、べん毛が独立に流体中に存在するときと同じであると仮定した。

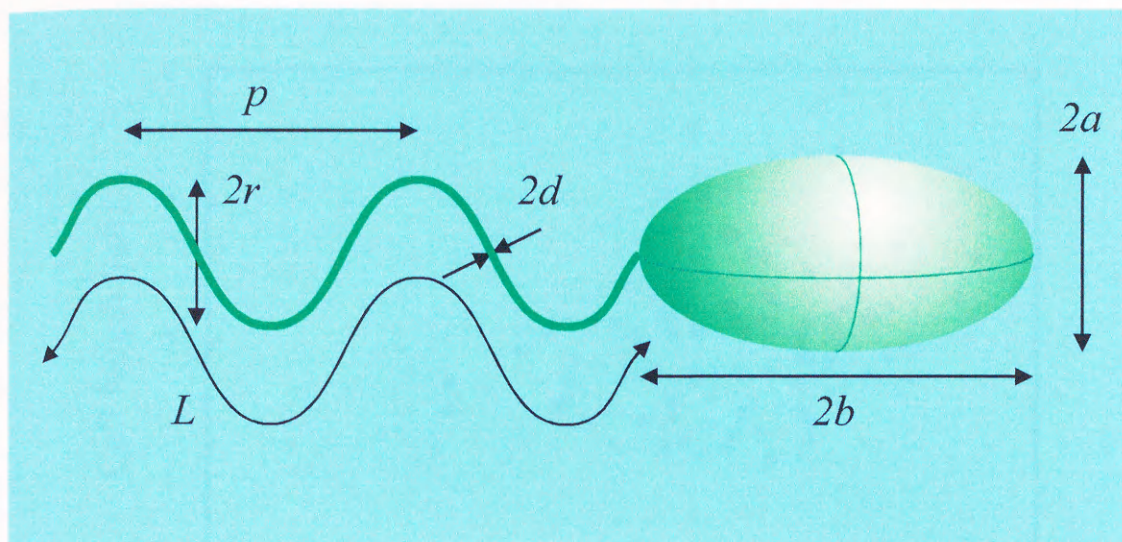


図24 菌体とべん毛の形状を表すパラメーター。

菌体は細長い回転楕円体、べん毛はらせん形の細い繊維と近似した。 a 、 b 、 p 、 r 、 d 、 L はそれぞれ、回転楕円体の短半径、長半径、べん毛らせんのピッチ、半径、べん毛繊維の半径、長さである。

表11 *V. alginolyticus* YM42 の菌体とべん毛の形態のパラメーター。

シンボル	パラメーター	平均値	標準偏差
		μm	μm
$2a$	菌体の幅	0.80	0.09
$2b$	菌体の長さ	1.92	0.46
$2d$	べん毛繊維の直径	0.032	0.004
L	べん毛繊維の長さ	5.02	1.15
p	べん毛らせんのピッチ	1.58	0.14
l	ピッチ当たりのべん毛繊維の長さ	1.82	0.16
r	べん毛らせんの半径	0.14	0.02

透過型電子顕微鏡を使って 111 個の細菌について測定した結果。べん毛らせんの半径は、べん毛らせんのピッチとピッチ当たりのべん毛繊維の長さから求めた (数式 28)。レーザー暗視野顕微鏡測定の前後で、平均の菌体の長さの違いは標準偏差の約 $1/3$ 、平均のべん毛繊維の長さの違いは約 $1/4$ しかなかったので、測定中にパラメーター値が変動する心配はないと考えられる。べん毛らせんのピッチは暗視野顕微鏡でも測定したが、その値は $1.5 \pm 0.2 \mu\text{m}$ であった。

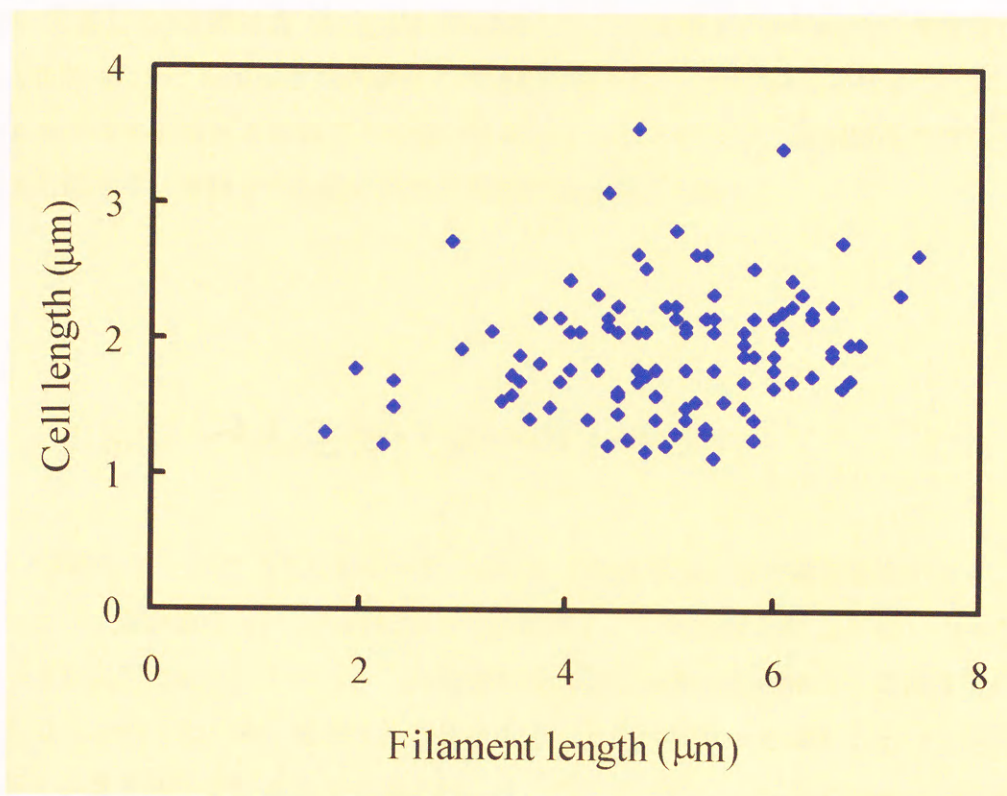


図25 *V. alginolyticus* YM42 の菌体の長さとべん毛の長さの間の相関。
それぞれの点は個々の細菌の菌体の長さとべん毛の長さの測定値を表す。サンプル数は111
である。ふたつのパラメーターの間の相関係数は0.21。

4.3.4 遊泳速度とべん毛回転数の比

数式 30、数式 33、数式 37より、遊泳速度とべん毛回転数は比例関係にあることがわかり、その比（v/f 値）を次のように求めることができる。

数式43
$$\frac{v}{\omega_f} = \frac{-\gamma_f}{\alpha_c + \alpha_f}$$

ここで予想されたように、実験でも大まかな比例関係が認められた（図 22）。数式 43に数式 35、数式 39、数式 41を代入すると、v/f 値は菌体とべん毛の形態のパラメーターだけを含み、粘度やべん毛モーターの発生トルクに関係しないことがわかる。v/f 値の実験結果が温度に依存しなかったことは、この結果とよく一致している。

計算した v/f 値は表 10 (p.51) に記載した。平均値は $0.137\mu\text{m}$ で、実験値より約 20%大きかったが、標準偏差は実験値と同程度であった。この計算上のばらつきは、細胞とべん毛の長さの個々の細菌ごとの違いに由来するものなので、実験結果のばらつきの主要因も同じく、細胞とべん毛の長さに由来すると考えられる。

4.3.5 べん毛モーターのトルク

前述したように、べん毛モーターのトルクを含まない形で解析を進めると、実験結果のうち、遊泳速度とべん毛回転数の比例関係と、その比例定数 (v/f 値) の大きさとばらつきを説明できる。しかし、べん毛回転数と遊泳速度の絶対値や一定温度での分布は説明できなかった。特に後者は、遊泳速度とべん毛回転数が比例するという前述の理論解析と一見矛盾しているように見える。そこでここでは、べん毛モーターの発生トルクを考慮して解析を進める。

まず、過去に報告された実験結果 (Manson et al., 1980; Lowe et al., 1987; Washizu et al., 1993; Iwazawa et al., 1993; Berg and Turner, 1993) からべん毛モーターのトルク特性を 2 種類仮定した。ひとつめはモーター回転数によらず一定トルクを発生するという特性である。これをトルク特性 1 とする (数式 44)。

$$\text{数式 44} \quad T_m = T_0$$

もうひとつは、モーター回転数に比例してトルクが減少するという特性である。これをトルク特性 2 とする (数式 45、数式 46)。

$$\text{数式 45} \quad T_m = T_0 \left(1 - \frac{\omega_m}{\omega_0}\right)$$

$$\text{数式 46} \quad \omega_m = \omega_f - \omega_c$$

また、溶液の粘度も計算に必要なパラメーターとなった。観察溶液には粘度を上げるような高分子化合物は含まれていないので、その粘度は水と同じであると考えた（表12）。

このように、べん毛モーターのトルク特性を仮定すると、遊泳速度やべん毛回転数を独立に求めることができる。その結果は以下のとおりである。

$$\text{数式47} \quad v = K_0 \beta_c \gamma_f$$

$$\text{数式48} \quad \omega_c = K_0 (\alpha_c \beta_f + \alpha_f \beta_c - \gamma_f^2)$$

$$\text{数式49} \quad \omega_f = -K_0 (\alpha_c \beta_c + \alpha_f \beta_c)$$

$$\text{数式50} \quad \omega_m = -K_0 (\alpha_c \beta_c + \alpha_c \beta_f + \alpha_f \beta_c + \alpha_f \beta_f - \gamma_f^2)$$

$$\text{数式51} \quad F_c = -F_f = K_0 \alpha_c \beta_c \gamma_f$$

$$\text{数式52} \quad T_c = -T_f = T_m = K_0 (\alpha_c \beta_c \beta_f + \alpha_f \beta_c \beta_f - \beta_c \gamma_f^2)$$

ただし、べん毛モーターがトルク特性1の場合、

$$\text{数式53} \quad \frac{1}{K_0} = \frac{\alpha_c \beta_c \beta_f + \alpha_f \beta_c \beta_f - \beta_c \gamma_f^2}{T_0}$$

トルク特性2の場合、

$$\text{数式54} \quad \frac{1}{K_0} = \frac{\alpha_c \beta_c \beta_f + \alpha_f \beta_c \beta_f - \beta_c \gamma_f^2}{T_0} - \frac{\alpha_c \beta_c + \alpha_c \beta_f + \alpha_f \beta_c + \alpha_f \beta_f - \gamma_f^2}{\omega_0}$$

である。

ここで得られたべん毛回転数の解（数式49）をもとに、べん毛モーターのトルクの値を見積もってみた。その方法は、菌体とべん毛の長さは図25に示された個々の細菌

の測定値、その他の形態のパラメーターは表 11 に示された平均値を用いて、111 のべん毛回転数の計算値を求め、その平均値と実験で得られた平均値が一致するように、べん毛モーターのトルクの値を決めた(表 13)。ただし、トルク特性 2 の場合、Iwazawa et al. (1993) の報告に従い、 ω_0 は温度に依存するが、 T_0 は温度に関係なく一定であると仮定した。

表12 観察溶液の粘度。

温度(°C)	25	30	35
粘度(millipoise)	8.9	8.0	7.3

水と同じであると仮定した。

表13 べん毛モーターのトルクの見積もり。

トルク特性 パラメーター	$T_m = T_0$	$T_m = T_0(1 - \omega_m/\omega_0)$	
	$T_0 (10^{-18} \text{ N}\cdot\text{m})$	$T_0 (10^{-18} \text{ N}\cdot\text{m})$	$\omega_0 \text{ (rps)}$
25°C	0.85	1.5	1700
30°C	1.01	1.5	3000
35°C	1.06	1.5	3800

4.3.6 ベン毛回転数と遊泳速度の計算結果

図 26に計算したベン毛回転数と遊泳速度の関係を示した。トルク特性 1 の場合 (図 26a) いくつかの点が高回転数、高速度のほうへ伸びているのに対して、トルク特性 2 の場合 (図 26b) には分布がコンパクトで実験結果 (図 22) に近い。どちらのトルク特性を仮定した場合も、実験結果の分布と大まかな傾向は似ていた。つまり、温度が高いほどベン毛回転数と遊泳速度は速くなる傾向があるが、一定温度のデータの分布だけを見ると高回転数側で飽和した。この分布の主原因は、ベン毛の長さのばらつきである。図 26の実線は、ベン毛の長さを測定値のばらつきの範囲と同程度に $1.5\mu\text{m}$ から $8.5\mu\text{m}$ まで変化させ、他のパラメーターは平均値を使ったときの計算値であるが、データがこの実線の周りに分布しているのがわかる。ベン毛の長さが短いほどベン毛が高速で回転する。トルク特性 1 では遊泳速度もそれに応じて単調に速くなるが、トルク特性 2 の場合には一旦速くなるもののその後しだいに遅くなってしまう。

このように、モータートルクまで考慮することによって見かけの飽和現象も説明することができた。実験結果のばらつきに比較すると、計算結果では実線からのばらつきの程度が小さいが、これはベン毛モーターの発生トルクの特性を細菌間でも一定であると仮定しているためであろう。これまでに報告されてきた解析 (Holwill and Burge, 1963; Chwang and Wu, 1971; Shimada et al., 1976; Azuma, 1992; Ramia et al., 1993) はモータートルクを考慮せずにすむように v/f 値だけを議論の対象としていたが、そのために今回の実験に現れたような見かけの飽和現象を指摘したものはなかった。この点に本章の研究の新規性がある。また、ここで使用したモデルは解析的に解くことができるので、実験への応用という点で有用である。

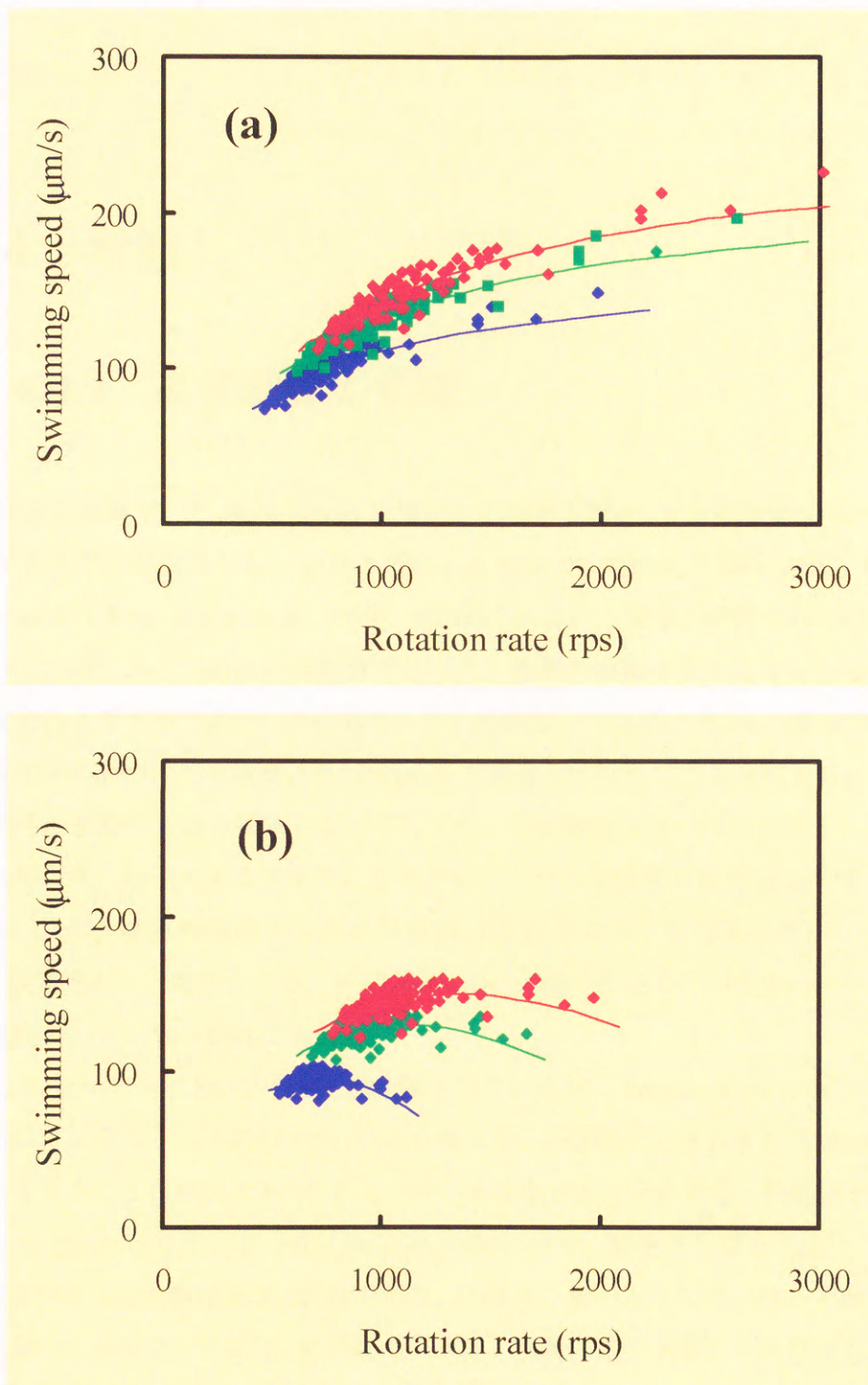


図26 ベン毛回転数と遊泳速度の計算結果。

(a)トルク特性1の場合。(b)トルク特性2の場合。

青、緑、赤はそれぞれ 25、30、35℃の計算値を表す。ただし、菌体の長さとベン毛の長さ以外の形態のパラメーターに関しては平均値を使った（表 11）。また、粘度とベン毛モーターのトルクは表 12、表 13の値を使った。点は、菌体の長さとして個々の測定値（図 25）を採用した場合の計算値である。実線は菌体の長さにも平均値を用い、ベン毛の長さを 1.5 μm から 8.5 μm まで連続的に変化させた場合の計算値である。

4.4 考察

4.4.1 高速回転の意味

今回の実験で、*V. alginolyticus* の極べん毛が約 1700rps (10 万 rpm) という高速で回転できることが判明した。これまでに、*E. coli* が 270rps (Lowe et al., 1987)、*S. typhimurium* が 170rps (Kudo et al., 1990) で回転したという記録が報告されている。これらに比べるとほとんど一桁上の回転数であった。菌体の回転を考えるとべん毛モーターの回転はこれよりさらに速い。べん毛モーターの回転子の直径を 30nm と仮定すると、回転子と固定子の間のすべり速度は約 160 μ m/s であると見積もることができる。べん毛モーター以外の運動する分子機械と比べてみても、この速度はたいへん大きい。例えば、筋肉中のモーター分子であるアクチンとミオシンのすべり速度は約 10 μ m/s である。*Chara* や *Nitella* のような植物細胞中の原形質流動は速いということで有名だが、それでも 100 μ m/s 程度である。今のところ、*V. alginolyticus* の極べん毛のべん毛モーターが生物界で最高速のモーター分子機械である。

このモーターは Na⁺の流れを駆動源としているが、*Streptococcus* の H⁺モーターで見積もられているように 1 回転当たり 1000 個の Na⁺が細胞内に流入する (Meister et al., 1987) とすると、1 秒間に 1.7 $\times 10^6$ もモーターを通過することになる。細胞質の Na⁺濃度は約 50mM と報告されている (Yoshida et al., 1990) ので、細胞の容積を 1 μ m³ と仮定すれば、細胞質内の Na⁺の数は約 3 $\times 10^4$ 個である。つまり、極べん毛のモーターを動かすために、細胞質内にある Na⁺の約 50 倍の数の Na⁺を 1 秒間に送り込まなければならない。逆に、細胞質内の恒常性を保つためには、同じ速度で Na⁺を細胞外へかい出す必要がある。

もしべん毛モーターのエネルギー変換効率を η_m とすると、次の式が成り立つ。

数式55
$$\eta_m \Delta \tilde{\mu}_{\text{Na}^+} I = T_m \omega_m$$

ただし、 $\Delta\tilde{\mu}_{\text{Na}^+}$ は Na^+ に関する細胞膜を介した電気化学的ポテンシャル差（ナトリウム駆動力）、 I は Na^+ 流、 T_m はべん毛モーターのトルク、 ω_m はモーターの回転数である。 $\Delta\tilde{\mu}_{\text{Na}^+}$ 、 $T_m\omega_m$ はそれぞれほぼ 200mV (20kJ/mol)、 8×10^{-15} J/s と見積もられているので、 η_m が 1 (100%) という理想的な機械を考えると、 I は約 2.4×10^5 /s 程度でよいことになる。先ほどの見積もりより一桁近く小さい値ではあるが、やはり細胞質内の Na^+ の個数に比べるとかなり大きい。

ほかにもナトリウムを使う分子機械は数多くあるはずなので、これらの値がもし正しければ細菌はひとときも休むことを許されないということを意味している。1 秒間に 10^4 個の Na^+ をかい出す能力のある Na^+ ポンプが細胞質内の Na^+ 濃度を維持しているとすると、細胞当たり 100 から 1000 個のポンプが働いていると考えられる。

4.4.2 実験結果と計算結果の定量的な差

ここで採用したモデルによって実験結果は定性的にうまく説明できたが、定量的には若干違いがあった。例えば、計算した平均の v/f 値は $0.137 \mu\text{m}$ で、実験値 ($0.113 \mu\text{m}$) よりも約 20% 大きい。この原因は単純化しすぎたモデルにあると思われる。本モデルでは、回転中のべん毛の変形、菌体とべん毛の間の流体力学的な相互作用、壁や他の細菌との流体力学的な相互作用、べん毛らせんの軸と菌体の軸のずれ、などを無視した。

べん毛らせんの変形によって生じる v/f 値の変化は大きい。例えば、ピッチ数及び繊維長がそのままピッチが測定値より 5% 短くなったとすると、 v/f 値は 21% 増加する。残念ながら、今はまだ回転中のべん毛らせんの変形がどの程度なのか知られていない。

菌体とべん毛との流体力学的な相互作用によって、遊泳速度は約 20% 減少すると見積もられている (Higdon, 1979)。

ほとんどの細菌はカバーガラスやスライドガラスの近くを壁面と平行に遊泳するのが、顕微鏡で観察される。おそらく菌体はなんらかの力をガラス表面から受けていると考えられる。流体力学的なこのような力は、平均の遊泳速度を減少させるが、その程度は 10% 以下であると数値的に解析されている (Ramia et al., 1993)。

べん毛モーターの軸はべん毛らせんの軸についているのではなく、べん毛繊維についているので、べん毛らせんと菌体の軸は当然ずれている。これによって、菌体がぶれたり、べん毛が変形し、 v/f 値が小さくなると考えられる。菌体のぶれ角度が遊泳軸に対して 30 度の場合、遊泳速度は 3% 減少すると見積もられた。また、菌体付近のべん毛が変形していることは、図 21 に示されているように、菌体のすぐあとのレーザー暗視野顕微鏡データの強度が後部のべん毛からのものよりも小さいことが示唆している。そのために、べん毛繊維の全長のうち一部は有効に推進力を発生していないのではないかと考えられる。

以上のように、 v/f 値に関する計算値と実験値の 20% のずれは、回転中のべん毛の変形、菌体とべん毛の間の流体力学的な相互作用、壁や他の細菌との流体力学的な相互作用、べん毛らせんの軸と菌体の軸のずれ、などに起因すると考えられる。

4.4.3 べん毛モーターのトルク特性

べん毛モーターのエネルギー変換機構を調べるために、発生トルクの回転数依存性は重要な情報になる。本モデルではふたつのトルク特性のタイプを仮定した。トルク特性 1 は回転数に無関係に一定トルクを発生し、トルク特性 2 は回転数に比例してトルクが減少するものである。トルク特性 1 は Manson et al. (1980) と Washizu et al. (1993)、トルク特性 2 は Lowe et al. (1987) と Iwazawa et al. (1993) がそれぞれ報告している。Berg and Turner (1993) は低速では一定トルク、高速では回転数に比例して減少するというトルク特性を報告した。この場合、遊泳中の細菌ではトルク特性 2 と同等である。

トルク特性 1 と 2 の違いが解析結果にもたらす影響のひとつは、図 26 にすでに示したように、べん毛回転数と遊泳速度のばらつきの大きさである。トルク特性 1 を仮定すると、実験結果よりも大きなばらつきが生じてしまう。これをさらに詳しく調べるために、べん毛繊維の長さの関数としてモーター回転数と遊泳速度を計算した (図 27)。トルク特性 1 ではべん毛が短いほどモーター回転数も遊泳速度も単調に増加する。ただし、その割合はモーター回転数のほうが急激で、計算上は無限に大きくなる。一方トルク特性 2 では、べん毛が短くなるとモーター回転数は単調に増加するが、有限の値 (ω_0) になるだけである。遊泳速度はべん毛長さが $3\mu\text{m}$ 付近で極大をとる。ふたつのトルク特性

による差は、べん毛の長さが $4\mu\text{m}$ よりも短い領域で顕著である。残念ながら、今回のようにレーザー暗視野顕微鏡を用いる実験では、実際のべん毛モーターのトルク特性がどちらであるかを検証することは難しい。なぜなら菌体の強い散乱光に隠れてしまうために、短いべん毛を持つ細菌のデータを得ることができないからである。そのために本実験で得られたデータも極端に短いべん毛を持つ細菌は含まれていないと考えられ、図 22 の測定値の分布からトルク特性を判断することはできない。

個々の細菌の菌体とべん毛繊維の長さを測定することができれば、遊泳速度やべん毛回転数からそのときのべん毛モーターの発生トルクの値を見積もることができる。さらに、モーター回転数と発生トルクの間関係を求めることもできよう。実際、レーザー暗視野顕微鏡のデータを見る（図 21）と、CELL と FLA の時間から菌体とべん毛の長さを求められそうである。しかしながら、菌体からの散乱光がきわめて強いために、CELL の長さは本来の長さよりも 2、3 倍になっており、誤差が大きすぎて決めようがなかった。それゆえ、本実験では透過型電子顕微鏡を用いて、遊泳速度とべん毛回転数とは別に菌体とべん毛の長さを決定することにしたが、その結果、べん毛モーターのトルク特性に関しては確かな証拠を提供するに至らなかった。

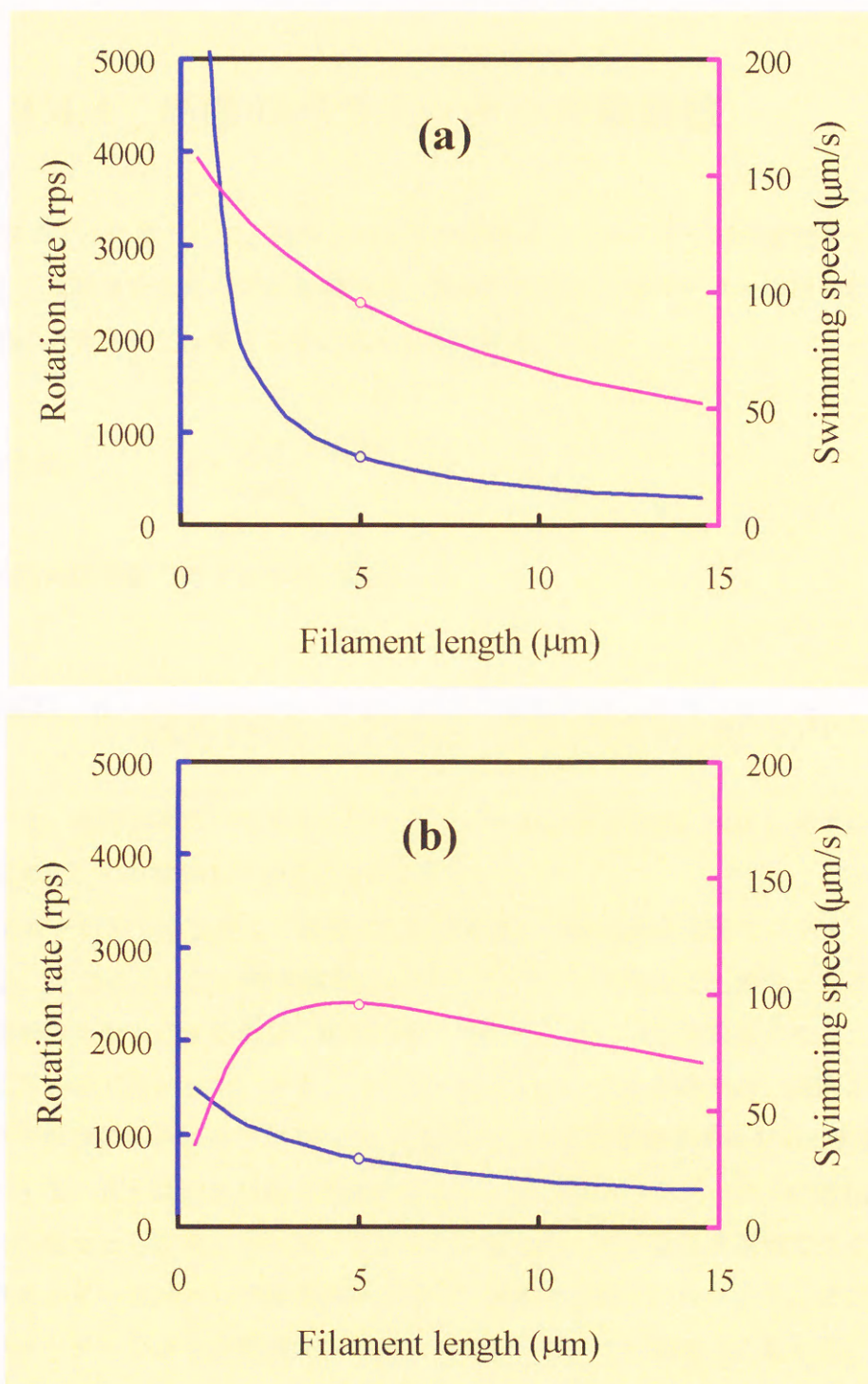


図27 ペン毛繊維の長さとペン毛回転数、遊泳速度の関係。

(a)トルク特性1の場合。(b)トルク特性2の場合。

25℃のときにペン毛の長さだけが変化した場合に、モーター回転数と遊泳速度がどのように変化するかを計算した。点はペン毛長さの測定値の平均を表す。

4.4.4 形態のパラメーターの最適値

本モデルに基づいて、菌体とべん毛の形態のパラメーターが推進効率と遊泳速度にどのような効果をもたらすかを調べた。推進効率はべん毛モーターの出力に対する菌体の推進に消費された仕事として、次のように定義した。

$$\text{数式56} \quad \eta = \frac{F_c v}{T_m \omega_m}$$

これを粘性抵抗係数で表すと次式になる。

$$\text{数式57} \quad \eta = \frac{\alpha_c \beta_c \gamma_f^2}{(\alpha_c \beta_f + \alpha_f \beta_f - \gamma_f^2)(\alpha_c \beta_c + \alpha_c \beta_f + \alpha_f \beta_c + \alpha_f \beta_f - \gamma_f^2)}$$

したがって、推進効率はべん毛モーターのトルクや溶液の粘度には依存せずに、菌体とべん毛の形状にのみ関係していることがわかる。

トルク特性2を仮定して計算した推進効率と遊泳速度を形態のパラメーターの関数として、図28に示した。推進効率はどのパラメーターに対しても極大となる点があった。推進効率を極大にする値は、菌体の幅、菌体の長さ、べん毛の長さでは、測定値の平均値にきわめて近かった。一方、べん毛らせんのピッチと半径では、実際の値とは違うところで推進効率が極大となる。べん毛繊維の太さは推進効率にほとんど影響しない。菌体とべん毛の長さは成長状態や環境で変化し、その他のパラメーターは遺伝子によって決まった値をとると考えられる。ところが、遺伝的に代々改良を蓄積できる可能性を持つパラメーターはけっして推進効率に関して最適化されていなかった。逆に、一代限りのパラメーターのほうが推進効率に関して最適化されているように見える。この結果は、推進効率は個体としては重要な因子であっても、種全体としてみるとそれほど重要視されていない、ということを示唆している。

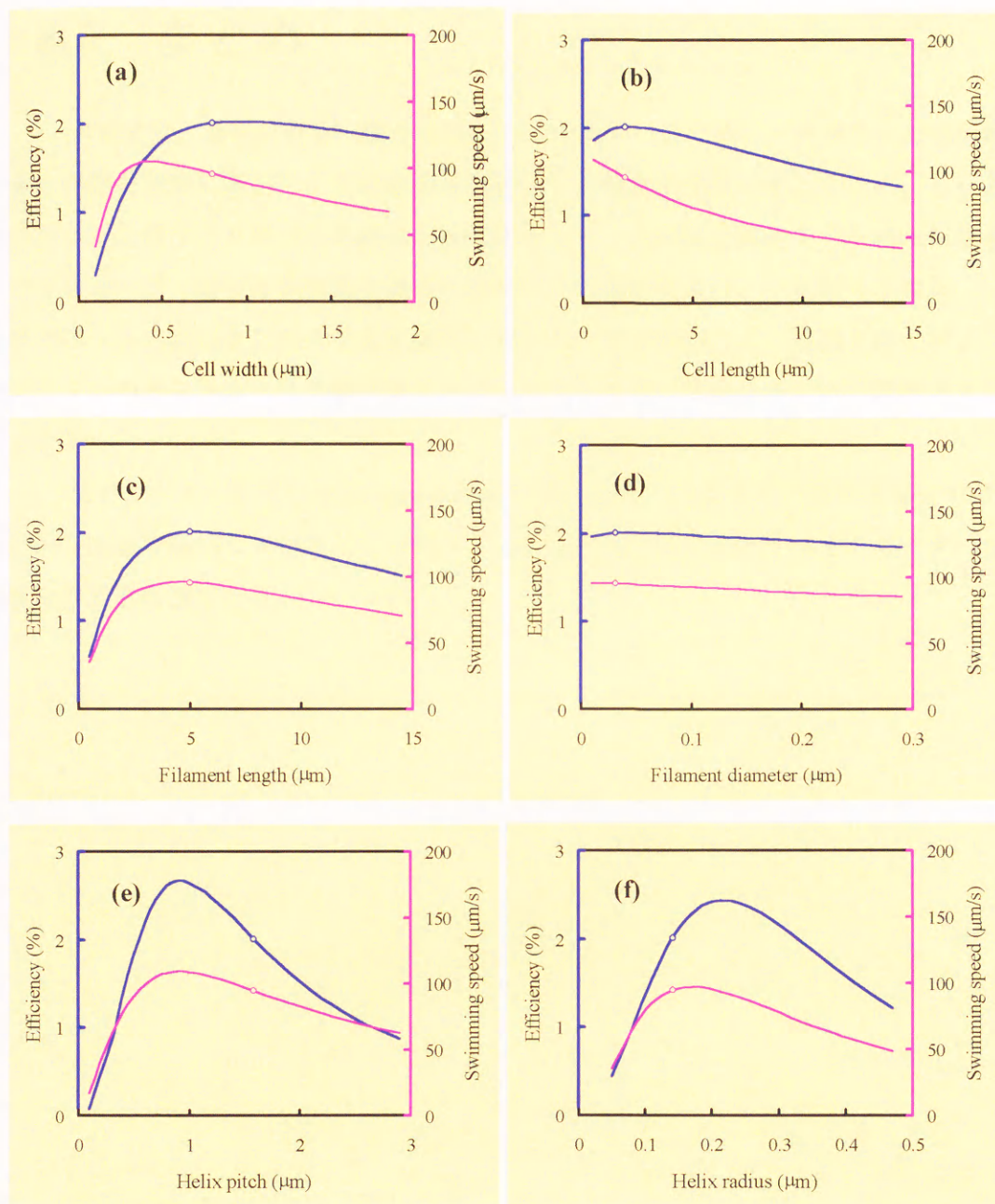


図28 形態のパラメーターと効率、遊泳速度の関係。

形態のパラメーターはそれぞれ、(a)菌体の幅、(b)菌体の長さ、(c)べん毛繊維の長さ、(d)べん毛繊維の幅、(e)べん毛らせんのピッチ、(f)べん毛らせんの半径、である。その他のパラメーターはすべて測定値の平均を使い、粘度とべん毛モーターのトルクは 25°C のときの値を用いて計算した。

4.5 まとめ

本章では、細菌の世界（微小世界）の力学を調べるために、細菌のべん毛回転数と遊泳速度を同時に測定し、その結果を解析した。解析を単純にするために、もっとも単純なべん毛型である単べん毛細菌を測定対象とし、高時間分解能でべん毛回転数を測定できるレーザー暗視野顕微鏡を測定に使用した。実験結果は、一見意外な現象、一定温度でのべん毛回転数に対する遊泳速度の見かけの飽和現象なども観察されたが、べん毛モーターの発生トルクも考慮することによってきわめて単純なモデルで説明することができた。

なお、本章で使用した *V. alginolyticus* の極べん毛のべん毛モーターは毎分 10 万回転という高速で回転していた。この値は、これまで知られていたすべてのモーター分子機械の中で最高速である。

5 周べん毛細菌の運動解析

第4章では、単べん毛細菌 (*Vibrio alginolyticus*) のべん毛回転数と遊泳速度をレーザー暗視野顕微鏡で同時に測定した結果、その運動が解析的に解くことができるほど簡単なモデルによって説明できることを示した。本章では、周べん毛細菌 (*Salmonella typhimurium*) の運動の同様な解析を紹介する。周べん毛細菌が遊泳しているとき、べん毛は束になって回転している。見た目にも、また流体力学的にも、べん毛間の相互作用はたいへん強いと考えられる。しかし、意外なことに、べん毛束を太い1本のべん毛と考えるモデルでは、実験結果をうまく説明できなかった。

5.1 背景と目的

細菌のべん毛の生え方にはいくつかの型がある。菌体の一方の極から1本だけ生えているもの（単べん毛）や、菌体の不規則な位置から複数生えているもの（周べん毛）などがある（図2）。遊泳中は周べん毛は安定な束を形成する。一般に、単べん毛細菌のほうが周べん毛細菌よりも速く泳ぐと報告されている（Macnab, 1976）。周べん毛のほうがべん毛の数が多いので、この現象は一見不思議な印象を与える。単べん毛と周べん毛とは流体力学的に何か違ったところがあるのかもしれない。それはべん毛型の多様性とも関連している可能性がある。

第4章で述べたように、単べん毛細菌 *V. alginolyticus* の運動をレーザー暗視野顕微鏡を用いて解析したところ、その結果は簡単なモデルをもとにした理論的な予測とかなりよく一致することがわかった。一定温度では遊泳速度がべん毛の高回転数側で飽和するという複雑に見える実験結果も、べん毛モーターのトルクを考慮することによって

説明することができた。周べん毛細菌では、Shimada et al. (1976)が *S. typhimurium* の遊泳速度とべん毛回転数を cinemicrography を用いて低速の範囲で測定した。しかしながら、実験で得られた v/f 値は理論値よりも2から3倍大きかった。彼らのモデルではべん毛の束を1本の太いべん毛と同じだと見なしていたが、べん毛束の流体力学的な挙動は単べん毛に比べるとかなり複雑なのかもしれない。

本章では、*S. typhimurium* の束になったべん毛の力学を研究するためにレーザー暗視野顕微鏡を適用し、高速領域の遊泳速度とべん毛回転数を同時に測定した。さらに、その結果を基に、束の中のべん毛に働く流体力学的な力を考察した。

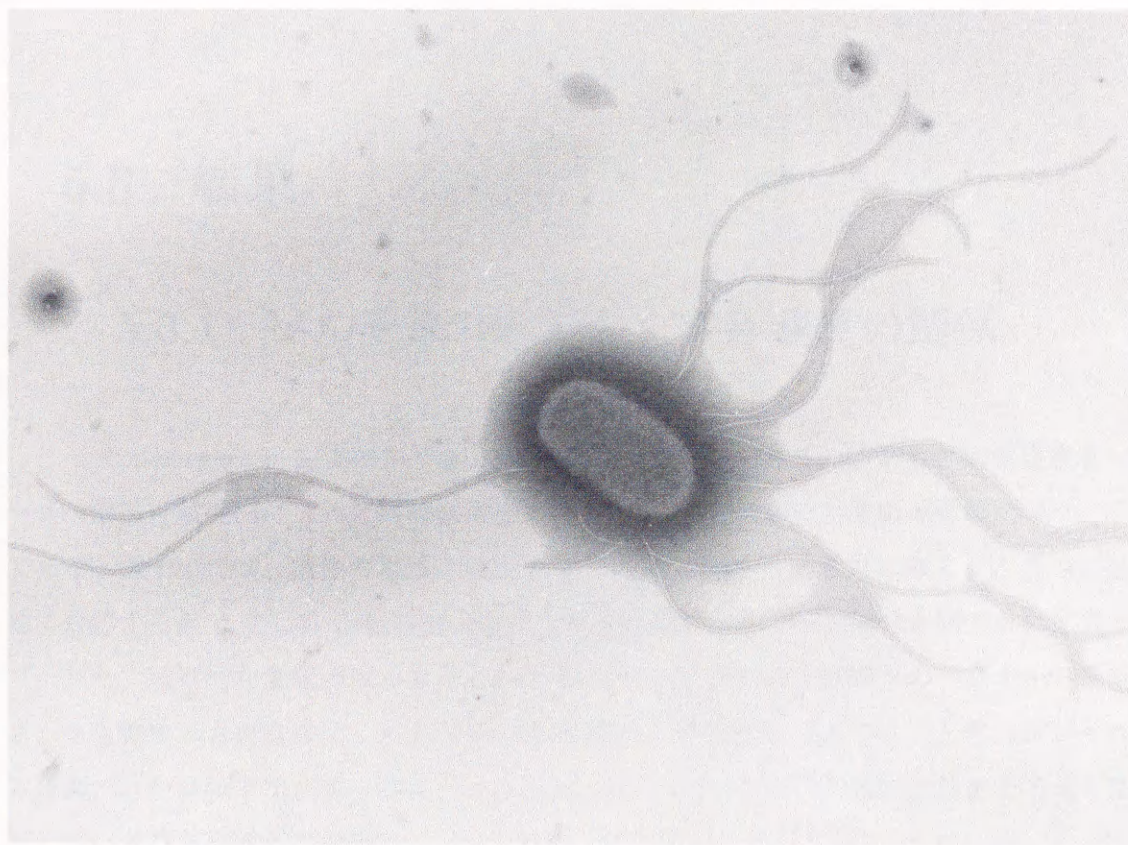


図29 *S. typhimurium* SJW3076 の電子顕微鏡写真。

SJW3076 は *cheA* から *cheZ* までの遺伝子領域を欠失した突然変異体で、タンブリングしない。

5.2 材料と方法

本研究では *S. typhimurium* のスムーズ突然変異体 SJW3076 (図 29 ; 第 6 章参照) を使用した。これを LB (1% peptone, 0.5% yeast extract, 0.5% NaCl) で振盪培養し、対数増殖期後期になったところで、遠心により集菌し、観察溶液 (10mM KH_2PO_4 , 20mM KCl, 10mM glucose; adjust pH 7.0 by KOH) に懸濁した。菌体数は $10^8/\text{ml}$ に合わせた。測定前に試料を 1 時間 25°C に保持した。べん毛束の回転数はレーザー暗視野顕微鏡により得られた光強度の時間変化から、また遊泳速度はビデオ記録画像から決定した (第 4 章参照)。菌体とべん毛の形態のパラメーターは透過型電子顕微鏡により測定した (第 4 章参照)。

5.3 結果

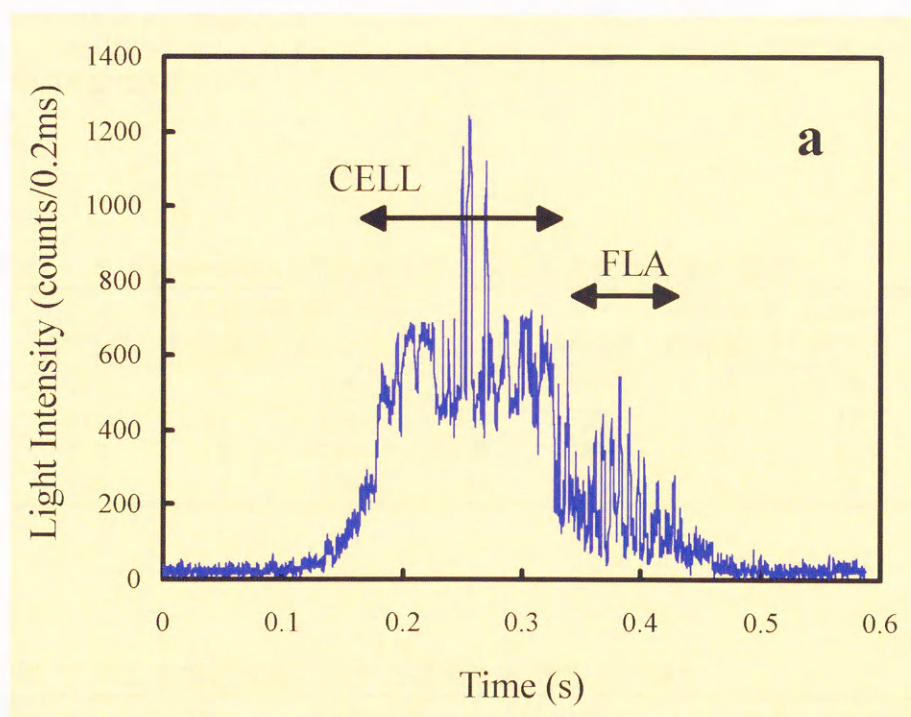
5.3.1 べん毛束の回転数と遊泳速度の関係

S. typhimurium SJW3076 の個々の細胞についてべん毛束の回転数と遊泳速度をレーザー暗視野顕微鏡によって同時に測定した。図 30 はレーザー暗視野顕微鏡データの例である。図 30a では、菌体の通過に対応する部分 (CELL) と、それに続くべん毛束の通過に対応する部分 (FLA) が他の部分とはっきり区別できる。FLA 部分を図 30b に拡大して示した。周期的な変化がはっきりとわかる。FLA 部分の信号は個々のべん毛から散乱された光強度の合計なので、それぞれの強度変化の位相がそろっているときしかピークは強調されないはずである。したがって、図 30b は束の中のべん毛が位相をそろえて回転していることを示している。

図 31 に、 25°C 、 30°C 、 35°C で測定した個々の細菌に対するべん毛束回転数と遊泳速度を示す。回転数も遊泳速度も温度とともに増加し、両者の間の関係は大まかには比例したが、データは広く分布していた。べん毛束回転数が大きい細菌が必ずしもより速く泳ぐとは限らなかった。これらの性質は第 4 章で述べた *V. alginolyticus* に対する結果と似ている。

表 14にべん毛束回転数と遊泳速度の測定結果をまとめた。べん毛束回転数と遊泳速度の平均値は、25、30、35℃でそれぞれ、112、162、198rps ; 29、43、55 μ m/s であった。この値は前章で測定した、*V. alginolyticus* に対する値 (690、910、1050rps ; 77、100、116 μ m/s) よりもかなり小さい。しかし、これまでに報告された他の周べん毛を持つ細菌に比べると、大差なかった (*Streptococcus* は 37℃で 170rps と 28 μ m/s、*Escherichia coli* は 32℃で 270rps と 36 μ m/s ; Lowe et al., 1987)。

表 15はべん毛束回転数に対する遊泳速度の比 (v/f 値) のデータをまとめたものである。v/f 値は個体差が大きかった。平均値は 0.27 μ m であったが、それぞれの測定値は 0.15 から 0.36 μ m まで広くばらついていた。平均値 0.27 μ m はべん毛のらせんピッチの 11% に相当する。第 4 章で述べた *V. alginolyticus* ではピッチの 7%であったので、その約 1.5 倍になる。この違いをもたらす機構上の差があると考えられる。v/f 値の平均値と分布が温度とほとんど相関がない点は、*V. alginolyticus* と同じであった。



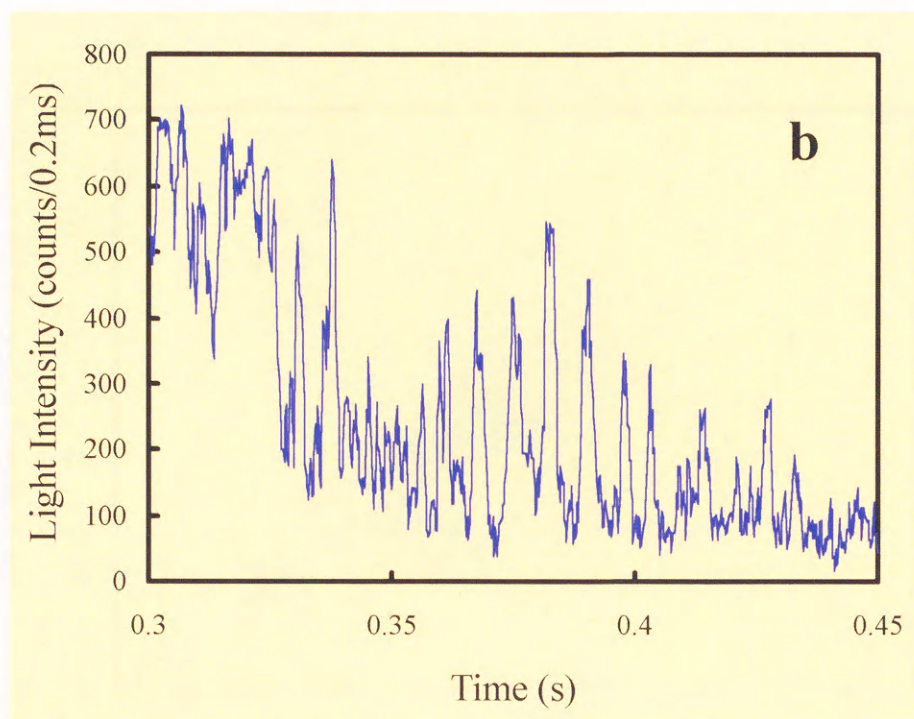


図30 *S. typhimurium* SJW3076 の L D M データの例。

- (a) 菌体が通過したあとペン毛がスリットを通過したことを示す、2段階 (CELL と FLA) の光強度の変化が見られる。
 (b) a の FLA 部分を拡大したグラフ。 *V. alginolyticus* と同様に、ペン毛の回転に相当する周期的な変化が見られる。

表14 *S. typhimurium* SJW3076 のペン毛束回転数と遊泳速度。

温度 (°C)	ペン毛束回転数 (rps)				遊泳速度 (μm/s)			
	平均値	標準偏差	最大値	最小値	平均値	標準偏差	最大値	最小値
全体	159	45	296	55	43	13	76	12
25	112	32	166	55	29	10	47	12
30	162	22	215	118	43	8	55	23
35	198	36	296	133	55	9	76	37

表15 ペン毛束回転数に対する遊泳速度の比 (v/f 値)。

温度 (°C)	平均値 (μm)	標準偏差 (μm)	最大値 (μm)	最小値 (μm)	試料数
全体	0.27	0.05	0.36	0.15	127
25	0.26	0.05	0.35	0.16	37
30	0.27	0.05	0.35	0.15	48
35	0.28	0.04	0.36	0.20	42

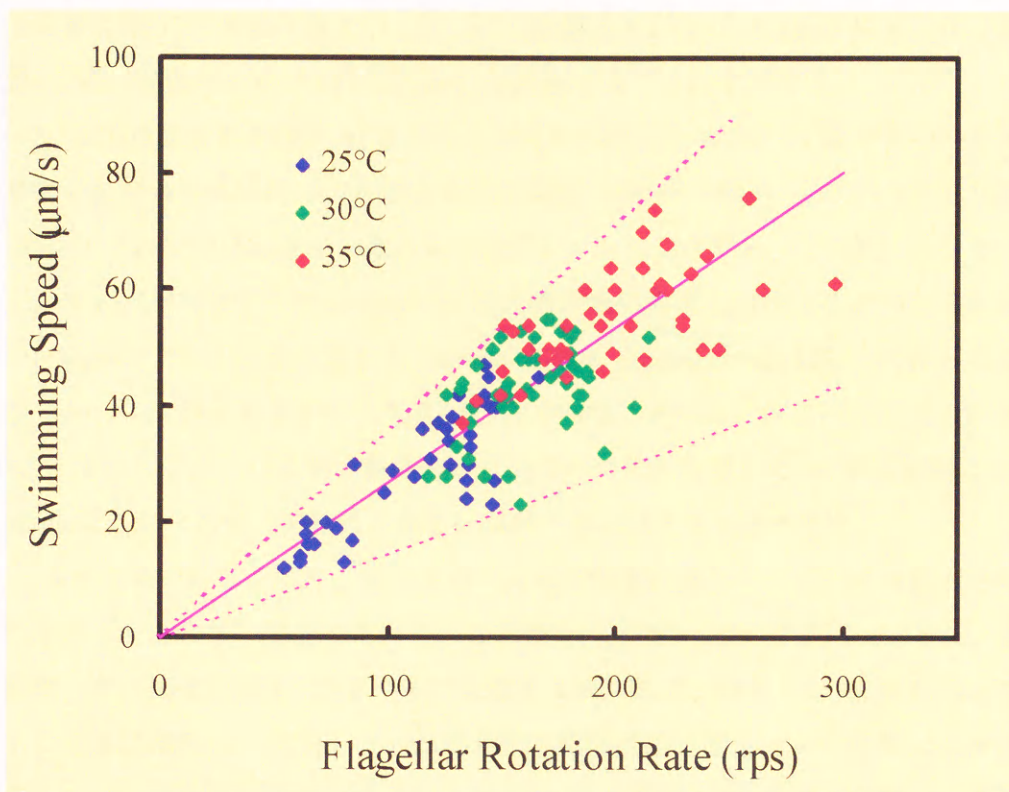


図31 *S. typhimurium* SJW3076 のべん毛束回転数と遊泳速度。
 点は各細菌の測定データを示す。実線と点線はそれぞれ、 v/f 値の平均値、最大値、最小値を表す。

5.3.2 v/f 値の解析

束の中のべん毛の流体力学的なふるまいを解析するために、ふたつの極端な仮定に基づいて v/f 値を計算した。ひとつめは、べん毛束を1本の太い極べん毛とみなす仮定である。この場合はべん毛繊維の太さを除けば、第5章の解析をそのまま使うことができる(数式43、p.55)。すなわち、菌体当たりのべん毛の本数を n 、べん毛繊維の半径を d としたとき、べん毛束の仮想的な繊維半径を $n^{1/2}d$ と仮定した。計算に必要な菌体とべん毛の形態に関するパラメーターは透過型電子顕微鏡で測定した(表16)。計算結果は図32に青色の点で示した。計算した v/f 値は $0.18\mu\text{m}$ ほどで、べん毛本数1から15の範囲(測定されたばらつきの範囲)ではほとんど本数によらなかった。この値は実験値(平均 $0.27\mu\text{m}$) に比べるとずっと小さかった。べん毛繊維の長さや菌体の長さは細菌ごとに異

なるが、これらの違いによって v/f 値にも違いが出てくる。この違いを考慮した場合の v/f 値の計算値は図 32 に青色の線で示した。その範囲は 0.14 から $0.22\mu\text{m}$ にしかならず、実験で得られた v/f 値の分布 (0.15 - $0.36\mu\text{m}$) を説明することはできない。

べん毛束の有効半径が $n^{1/2}d$ よりも大きい可能性もある。 v/f 値の平均の計算値を実験値に合わせるためには、べん毛本数の平均値 ($n=4.9$) において束の仮想的な繊維半径は $20n^{1/2}d$ 、つまり $0.53\mu\text{m}$ にしなければならない。しかしながら、この値はありそうもないほど大きい。なぜなら、べん毛束の直径は暗視野顕微鏡で観察するとべん毛らせんの直径 ($0.36\mu\text{m}$) よりも小さく見える (Macnab, 1976; Shimada et al., 1976) のに、この値はべん毛らせんの直径よりもずっと大きいからである。さらに、仮にべん毛束の有効半径が $20n^{1/2}d$ だとしても、べん毛と菌体の長さのばらつきを考慮した v/f 値の範囲は 0.21 から $0.30\mu\text{m}$ にしかならず、実験値の分布を説明するにはまだ小さすぎた。

ふたつめの仮定として、束の中のべん毛は別個に動作し、互いに流体力学的に相互作用を及ぼし合わない場合を考えた。この場合の v/f 値は補足の数式 69 (p.82) に基づいて計算した (図 32 赤色)。ひとつめの仮定とは対照的に、計算した v/f 値はべん毛本数とともに急激に増加し、 $0.35\mu\text{m}$ (べん毛本数が無限大に近づくときの理論上の漸近値) に漸近した。べん毛本数の平均値 (4.9) における v/f 値は $0.29\mu\text{m}$ で、実験値ときわめて近かった。べん毛本数に加えて、べん毛と菌体の長さのばらつきも考慮すると、 v/f 値の範囲は 0.14 から $0.34\mu\text{m}$ になった。よって、実験で得られた v/f 値の平均値とばらつきの両方とも、この仮定とよく合った。

v/f 値に関する以上の結果は、ふたつめの仮定 (束の中のべん毛は別個に動作し、互いに流体力学的に相互作用を及ぼし合わない) の妥当性を示しているように見える。

表16 *S. typhimurium* SJW3076 の形態のパラメーター。

記号	パラメーター	平均値	標準偏差	最大値	最小値
2a	菌体の太さ (μm)	0.73	0.02		
2b	菌体の長さ (μm)	1.4	0.3		
n	べん毛の本数	4.9	3.0	15	1
L	べん毛繊維の長さ (μm)	5.7	1.2		
d	べん毛繊維の半径* (μm)	0.012			
p	べん毛らせんのピッチ (μm)	2.5	0.2		
r	べん毛らせんの半径 (μm)	0.18	0.03		

28 個の細菌について透過型電子顕微鏡で測定した結果。*べん毛繊維の半径は Namba et al. (1989) の値を採用した。

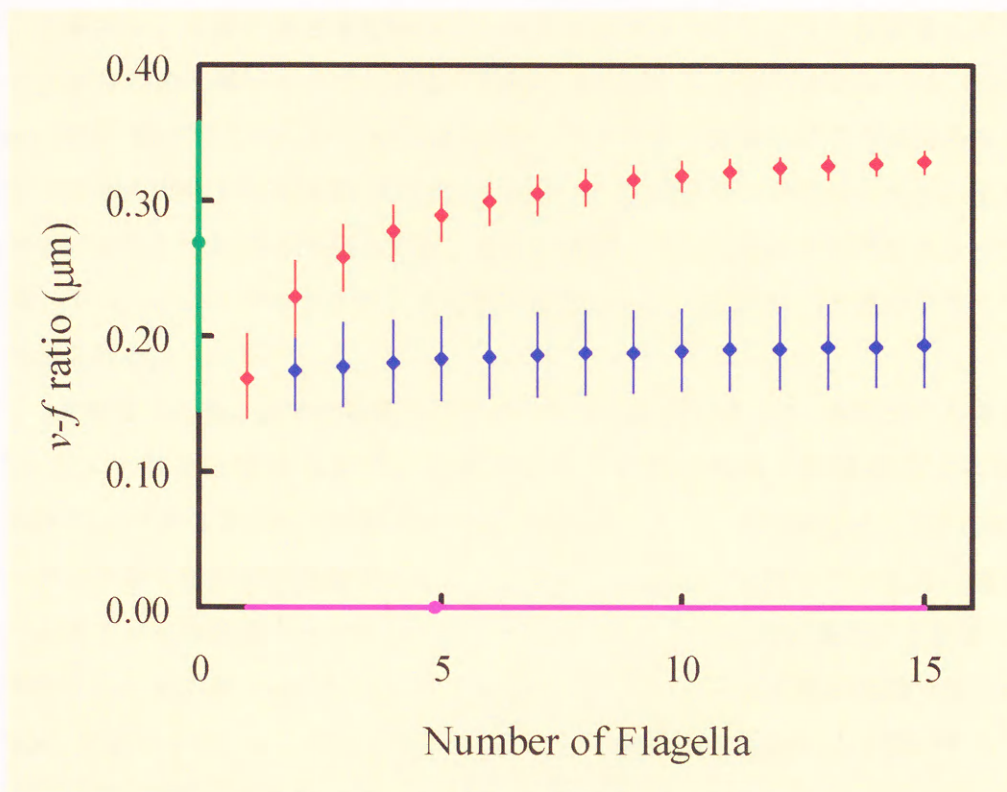


図32 菌体当たりのべん毛本数に対する計算した v/f 値。

青色はべん毛束を1本の太いべん毛と仮定した計算結果、赤色はそれぞれのべん毛が独立に作用するとした仮定した計算結果を示す。点はべん毛長さの平均値を使った場合、線はべん毛長さのばらつきを考慮した場合を表す。紫色はべん毛の本数の測定値で、点は平均値を表す。緑色は測定した v/f 値で、点は平均値である。

5.4 考察

5.4.1 高粘性下での実験

本章と似た研究は、Shimada et al. (1976)によって cinemicrography を使って *S. typhimurium* SJ25 に対しておこなわれた。べん毛束回転数を画像によって測定するために、彼らはべん毛束を安定化し回転を遅くする手段としてメチルセルロースを使用した。彼

らが報告した v/f 値は 0.50 から $0.75\mu\text{m}$ (べん毛らせんピッチの 24 から 36%) で、本章で得られた値の 2、3 倍の大きさであった。メチルセルロースのような粘性を上げる溶液は、それがきわめて薄いときでも高度に構造化されていると報告されている (Berg and Turner, 1979) ので、このくいちがいはメチルセルロースの添加によるものである可能性が高い。本章の実験では SJW3076 はメチルセルロースを含まない溶液中でべん毛束 1 回転当たりべん毛らせんの 11% 進んだが、逆に言えば、べん毛束は 89% だけスリップしたと表現してもよい。メチルセルロース溶液中ではスリップが減り、 v/f 値が大きくなるのだと考えられる。

v/f 値はべん毛と菌体の形態のパラメーターに影響を受ける。特に、べん毛らせんのピッチと半径の影響は大きい。本章の研究では透過型電子顕微鏡による測定で SJW3076 のピッチは $2.5\mu\text{m}$ 、半径は $0.18\mu\text{m}$ であった。一方、Shimada et al. (1976) は SJ25 のピッチと半径を暗視野顕微鏡測定によって 2.2 と $0.23\mu\text{m}$ と決定した。後者の値を使うと、べん毛束が有効繊維半径の単べん毛と同じであるとする仮定に基づいて計算した v/f 値は平均のべん毛本数 ($n=4.9$) において $0.28\mu\text{m}$ となる。これは本章の実験で得られた値 ($0.27\mu\text{m}$) に近い。しかし、やはり分布の拡がり (0.15 から $0.36\mu\text{m}$) まで説明することはできなかった (0.22 から $0.34\mu\text{m}$)。

5.4.2 束の中のべん毛

仮想的な単一べん毛の仮定は、流体力学的にはべん毛どうしがすきまなく接触しているモデルに相当する。一方、個別に動作する仮定は、べん毛間のすきまが十分に大きく各べん毛のまわりの流れは他のべん毛の影響を受けないというモデルに相当する。実験的に得られた v/f 値だけから判断すると、現実のべん毛束は後者のモデルに近いように見える。しかしながら、暗視野顕微鏡による観察 (Macnab, 1976; Shimada et al., 1976) からは、束の直径は比較的小さいと見られる。幾何学的な解析からも、細菌の遊泳中にはべん毛の間には直接機械的な相互作用が働いて安定な束を形成すると考えられている (Macnab, 1977)。

流体力学的な観点からは、束の中のべん毛の小部分は低いレイノルズ数における一様流中の等しい半径を持つ平行な円柱と見なすことができるかもしれない。理論的あるいは実験的な流体力学の研究によれば、一様流に対して垂直な平面内に軸を持つふたつの平行な円柱には互いに反発する成分を含む力が働き、円柱の中心を結ぶ直線が流れに平行なときには引き合う成分を含む力が働くことが示されている (Fujikawa, 1956; Kuwabara, 1957; Taneda, 1957)。ふたつの円柱の間の距離が大きくなるにつれて、流体力学的な力のうちの反発する、あるいは引き合う成分は小さくなり、それぞれの円柱に働く全抵抗力は大きくなり、しだいに一様流中に単一の円柱が存在する場合の力に漸近する。一様流に対して垂直な平面内に軸を持つふたつの平行な円柱の単位長さあたりに働く抵抗力 D と揚力 (流れに垂直な方向に働く力) L は、Fujikawa(1956)によれば、

$$\text{数式58} \quad D = 2\rho U^2 a C_D$$

$$\text{数式59} \quad L = 2\rho U^2 a C_L$$

$$\text{数式60} \quad C_D = \frac{4\pi}{R(2S - \kappa - 1)} \{1 + O[(\frac{a}{h})^4]\}$$

$$\begin{aligned} \text{数式61} \quad C_L &= \frac{\pi(2S - 2\kappa - 1)}{2(2S - \kappa - 1)} (\frac{a}{h}) \\ &\times \{1 + \frac{1}{4}(\frac{1}{\kappa} + \frac{5 - 8S}{2S - 2\kappa - 1})(\frac{a}{h})^2 + O[(\frac{a}{h})^4]\} \end{aligned}$$

$$\text{数式62} \quad R = \frac{2\rho U a}{\mu}$$

$$\text{数式63} \quad S = \frac{1}{2} - \gamma - \log[\frac{R}{8}]$$

$$\text{数式64} \quad \kappa = \log[\frac{2h}{a}] - \frac{1}{2}$$

ただし、 U は一様流の速度、 ρ は密度、 μ は粘度、 a は円柱の半径、 $2h$ は円柱軸間の距離、 γ はオイラ一定数 (0.5772...) である。ここで $2h$ を無限大にすると、単独で存在する円柱に働く抵抗力を求めることができるが、そのときの抵抗係数 C_{D*} は、

数式65

$$C_D^* = \frac{4\pi}{RS}$$

である。図 33はふたつの円柱の相互作用が抵抗力に及ぼす影響を示したグラフである。これからべん毛の大きさでは、円柱間の距離が少々変わろうが、抵抗力はほとんど影響を受けず、円柱どうしがぴったりくっついていてる場合と大差ないことがわかる。つまり、流体力学的な観点からしても、束の中のべん毛間の相互作用が無視できるという仮定は承認しにくい。

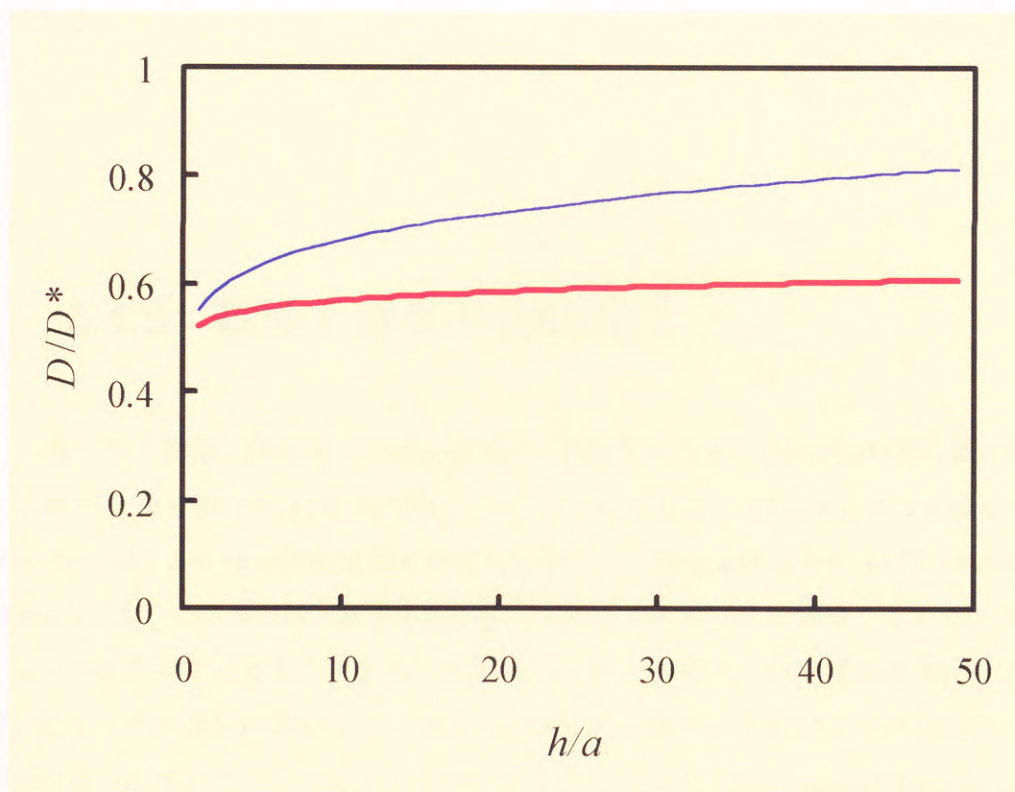


図33 平行な2本の円柱間の距離とそれに働く抵抗力の関係。

赤線は細菌のべん毛のパラメーターを使った場合（べん毛繊維の半径 12nm、べん毛らせんの半径 0.12 μ m、べん毛回転数 200rps を想定した）、青線は大きさをその 50 倍にした場合（べん毛繊維の半径が 600nm）を示す。横軸は円柱半径と円柱軸間の距離の比、縦軸は円柱が単独で存在する場合に対する抵抗力の比である。

しかしながら、現実には、*S. typhimurium* のべん毛回転数と遊泳速度の測定結果は、*V. alginolyticus* の場合とは異なり、理論的に予想される結果と一致しなかった。これは微小世界における流体力学において未発見の現象が残っているのではないかと期待させる。例えば、束の中のべん毛の相互の位置関係は常に変化しているために、一様な流れの中の円柱というモデルは現実を表していない可能性がある。つまり、非定常状態の流体力学を考えなければならないのかもしれない。また、べん毛束の中の水の運動のように数 10nm 程度の大きさになると、単純な流体として解析することができなくなって、ブラウン運動の場合のように個々の水分子の運動まで考慮する必要があるのかもしれない。さらに、固体の表面には構造化された水の層が存在しているが、これが運動全体に影響を及ぼしていることも考えられる。これらの要因が複雑に絡み合って、細菌運動を特徴づけているのだとすると、微小世界の流体力学の今後の発展と応用がたいへん楽しみである。

5.4.3 粘性と細菌の運動様式

速く泳ぐ細菌、例えば、*Pseudomonas* や *V. alginolyticus* (Macnab, 1976; 第4章) は単一の極べん毛を持っているのに対して、周べん毛細菌、例えば、*S. typhimurium*、*Escherichia coli*、*Streptococcus* はあまり速く泳がない (Berg and Brown, 1972; Macnab and Koshland, 1972)。この事実は、細菌は速く泳ぐ目的でべん毛の数を増やしているわけではないことを物語っているようである。海洋性 *Vibrio* のあるものは粘度が増加するとべん毛型を変えてその状況に適応する。液体中では単一の極べん毛を持っているのに、固体表面では周べん毛を生やして這うことができるようになる (Shinoda and Okamoto, 1977)。粘度の増加、抗体の結合、モーターの阻害剤などによって、極べん毛の回転が妨害されると、周べん毛の遺伝子が発現されることが報告されている (McCarter et al, 1988; Kawagishi et al, 1996)。海洋性 *Vibrio* のこのようなふるまいは、粘度の高い環境下では複数のべん毛のほうが単一のべん毛よりも何らかの優位性を持っていることを示唆している。

スピロヘータは今までに述べてきた細菌とはまったく異なる泳ぎ方をする。すなわち、らせん状の菌体をらせん軸の回りに回転させて泳ぎ、べん毛は内膜と外膜の間の空間に存在している (Holt, 1978)。スピロヘータは粘度の高い環境に適応しているようで、水の数百倍の粘度までなら粘度が高いほど速く泳ぐ (Kaiser and Doetsch, 1975)。周べん毛細菌や極べん毛細菌でもわずかに粘度を上げたときに遊泳速度が増加する場合があることが報告されている (Shoosmith, 1960; Schneider and Doetch, 1974)。これらの観察は v/f 値が粘度によって変化することを示唆しているが、理論的には v/f 値は粘度と無関係である。遊泳速度は粘度のほかに粘性試薬の種類にも依存する (Berg and Turner, 1979) ので、溶液の構造の重要性が示唆されている。自然界ではある種の細菌はこのような構造を有効に活用しているように見える。しかしながら、細菌の運動に対する粘性試薬の効果は、ほとんどの場合遊泳速度に関してしか調べられていない。粘度と溶液の構造に対する、遊泳速度とべん毛回転数の関係の依存性をもっと詳しく調べるのが、細菌遊泳の力学の解明につながると思われる。このような研究も細菌におけるべん毛型の多様性と微小世界の流体力学に重要な洞察をもたらすに違いない。

5.5 まとめ

本章の結果が示唆しているように、微小領域の溶液環境は単純な流体として取り扱うことはできないかもしれない。生物が生活している環境では、水にはさまざまな物質が溶解あるいは懸濁している。それらの物質が存在するために、純粋な水が持ち得なかった性質や構造が、溶液には付加されていると考えられる。さらに、生物は液体中というよりは、固体や気体との界面やその周辺に棲息している場合が多い。このような環境も、単純な流体の性質だけで説明できない現象を持っている可能性がある。さらに、これまで無視してきた個々の水分子の運動も考慮する必要があるのかもしれない。非定常状態の運動の解析も重要なテーマであろう。すでに体系化されている流体力学で無視してきたこれらの因子によって、実際の現象と理論とのずれが生じる可能性がある。そのずれは微小な領域ほど大きくなると考えられる。実際、細菌のべん毛型 (運動形態)

の多様性を見ると、それらは微小世界の流体力学を知りつくした上で、うまく利用するために独自の運動形態を発展させてきたように見える。

5.6 補足

束の中のべん毛が独立に動作するという仮定では、図 34 のモデルを用いて計算した。この場合の並進の運動方程式は次のように表すことができる。

$$\text{数式66} \quad F_c + \sum_{i=1}^n F_{fi} = 0$$

ただし、 F_c は菌体に働く粘性抵抗、 F_{fi} は i 番目のべん毛に働く粘性抵抗である ($i=1..n$)。ここで、単べん毛のときと同じように、粘性抵抗は、

$$\text{数式67} \quad F_c = \alpha_c v$$

$$\text{数式68} \quad F_{fi} = \alpha_f v + \gamma_f \omega_f$$

なので、 v/ω_f 値は、

$$\text{数式69} \quad \frac{v}{\omega_f} = \frac{-n\gamma_f}{\alpha_c + n\alpha_f}$$

となる。ただし、 α_c 、 α_f 、 γ_f は菌体とべん毛の粘性抵抗係数で、それぞれ数式 35、数式 39、数式 41 (p.52) のように表すことができる。

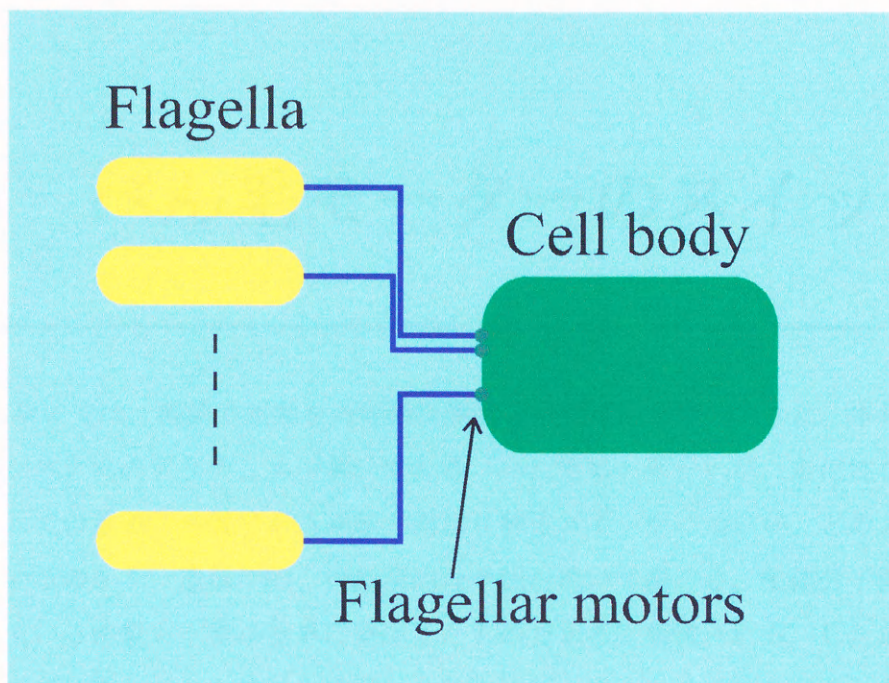


図34 複数のべん毛を持つ細菌の運動モデル（概念図）。

同じべん毛が同じ極から n 本生えているが、べん毛どうしの相互作用はないと仮定している。つまり、べん毛が菌体に与える影響は、単純に1本の場合のべん毛の影響の n 倍であるとした。

6 ベン毛モーターのスイッチ

前章までは、細菌の運動を力学的な環境との関連から調べてきた。本章では、細菌の運動システムのアクチュエーターである「ベン毛モーター」が、走化性システムの一要素としての重要な性質である回転方向切り替えスイッチについて、どのような性質を持っているのかを、遺伝学的、行動学的な手法を用いて調べる。生体分子機械そのものが持っている性質も、微小世界に適応したものであると期待される。したがって、人間がこれまでに作ってきた機械の性質と比較すれば、微小世界の特徴が浮かび上がってくると考えられる。

6.1 背景と目的

細菌は長い年月にわたって微小世界を活動の場としているので、使っている生体分子機械やそれらを統合したシステムの性質は微小世界に適合したものであると考えられる。細菌の運動については第2章で基礎的な事項を整理したが、本章ではベン毛モーターの回転方向スイッチの性質にしばって、その性質を明らかにすることを目的とする。

6.1.1 走化性システムの構成要素

細菌の走性の中で、走化性はもっとも研究の進んだ分野である。走化性システムは、センサーである「化学受容体 (Chemoreceptor)」、コントローラーである「走化性信号伝達系 (Che system)」、アクチュエーターである「べん毛 (Flagella) とべん毛モーター (Flagellar motor)」から構成されている (図 35; Stock et al., 1991)。走化性システムを構成する分子機械はタンパク質でできていて、それをコードする遺伝子との対応関係もほとんどわかっている (表 17; Jones and Aizawa, 1991)。簡単に言ってしまえば、走化性物質が細胞膜に存在する化学受容体に結合すると、その信号が走化性信号伝達系に伝わり、変換されて、べん毛モーターの回転方向を制御する (今栄, 1990; Stock et al., 1991)。実際には次のような過程で信号が伝わると考えられている (図 35 参照)。化学受容体に忌避物質が結合するか、それから誘因物質が解離すると、まず CheW の影響下で CheA のリン酸化が起こり、次にこのリン酸基が CheY に移る。リン酸化された CheY はタンブル信号としてべん毛モーターに作用する。CheZ は CheY の脱リン酸化を促進する。逆に、化学受容体に誘因物質が結合するか、忌避物質が解離すると、CheA のリン酸化が抑制され、リン酸化された CheY のレベルが下がる。以上の反応が興奮である。

しかし、前述したように、興奮だけでは刺激の絶対値にしか応答できないので、広い濃度範囲に対しての応答や同時に存在する複数の刺激に対しての応答など、実際の生存に必須の能力を獲得できない。そのためには、刺激の変化だけを真の刺激と感じる適応という性質を持っていなければならない。細菌は化学受容体の感度を可逆的に調節することによって適応の機構を構築している。つまり、CheA のリン酸化が促進される (化学受容体に忌避物質が結合し、最終的にタンブリング頻度が上昇する) 方向にある場合、CheA のリン酸基は CheB にも移り、CheB の化学受容体に対する脱メチル化活性が上昇する。CheR は化学受容体に対するメチル化活性を持っている。化学受容体のメチル化のレベルが低下するほど、同じ刺激に対して CheA のリン酸化活性が上昇するので、最終的な CheA のリン酸化のレベルは刺激の有無に関わらずそれほど変化しない。つまり、CheY のリン酸化のレベルも大きな変化はないので、定常状態におけるタンブリング頻度にも大きな差はないということになる。ただし、CheY のリン酸化のスピードは化学受容体のメチル化のスピードよりもずっと速いので、過渡的な応答が興奮であると言えることができる。

このように、細菌の走化性では、細胞室内の走化性信号変換系が化学反応によって組み上げられている。いわば、化学反応による論理回路が構成されているのである。この回路の特徴は、情報の統合（多くの化学受容体からの信号を処理している）、記憶（適応には少し前の状態を記憶しておくことが必要）といった複数の機能を、細胞質という空間的に同一の場所で実現していることである。

表17 *E. coli* と *S. typhimurium* の走化性システムの遺伝子。

Region	Gene symbol	Gene product (Function and comments)
I	<i>flgA</i>	Necessary for addition of P ring
	<i>flgB</i>	Rod structural protein
	<i>flgC</i>	Rod structural protein
	<i>flgD</i>	Completes rod structure
	<i>flgE</i>	Hook structural protein
	<i>flgF</i>	Rod structural protein
	<i>flgG</i>	Distal rod structural protein
	<i>flgH</i>	L ring structural protein
	<i>flgI</i>	P ring structural protein
	<i>flgJ</i>	Unknown
	<i>flgK</i>	HAP1 structural protein; between hook and filament
	<i>flgL</i>	HAP3 structural protein; between hook and filament
II	<i>flhE</i>	Unknown
	<i>flhA</i>	Unknown
	<i>flhB</i>	Unknown
	<i>cheZ</i>	Restores counterclockwise rotation of the flagellar motor
	<i>cheY</i>	Causes clockwise rotation of the flagellar motor
	<i>cheB</i>	Methylesterase
	<i>cheR</i>	Methyltransferase
	<i>tap</i>	Receptor for dipeptides; not present in <i>S. typhimurium</i>
	<i>tar</i>	Receptor for aspartate, maltose, Co^{2+} , and Ni^{2+}
	<i>cheW</i>	Enhances CheA autophosphorylation
	<i>cheA</i>	Autophosphorylates; transfers phosphate to CheY and CheB
	<i>motB</i>	Necessary for motor rotation
	<i>motA</i>	Necessary for motor rotation
	<i>flhC</i>	Sigma factor for transcription of level-II operons
	<i>flhD</i>	Sigma factor for transcription of level-II operons
III	<i>fliA</i>	Sigma factor for transcription of level-III operons
	<i>fliB</i>	N-Methylation of certain lysine residues of flagellin; not present in <i>E. coli</i>
	<i>fliC</i>	Filament structural protein (flagellin)
	<i>fliD</i>	HAP2 structural protein; caps of the distal end of filament
	<i>fliS</i>	Unknown
	<i>fliT</i>	Unknown
	<i>fliE</i>	Basal-body component
	<i>fliF</i>	M ring structural protein
	<i>fliG</i>	Switch component

	<i>fliH</i>	Unknown
	<i>fliI</i>	Unknown
	<i>fliJ</i>	Unknown
	<i>fliK</i>	Hook-length control
	<i>fliL</i>	Unknown
	<i>fliM</i>	Switch component
	<i>fliN</i>	Switch component
	<i>fliO</i>	Unknown
	<i>fliP</i>	Unknown
	<i>fliQ</i>	Unknown
	<i>fliR</i>	Unknown
<i>flj</i> (<i>Sal.</i>)	<i>fljA</i>	Repressor of <i>fliC</i> transcription
	<i>fljB</i>	Filament structural protein (flagellin)
	<i>hin</i>	Invertase controlling flagellar phase variation

flj 領域は *S. typhimurium* だけに存在する。Jones and Aizawa (1991)を参考にした。

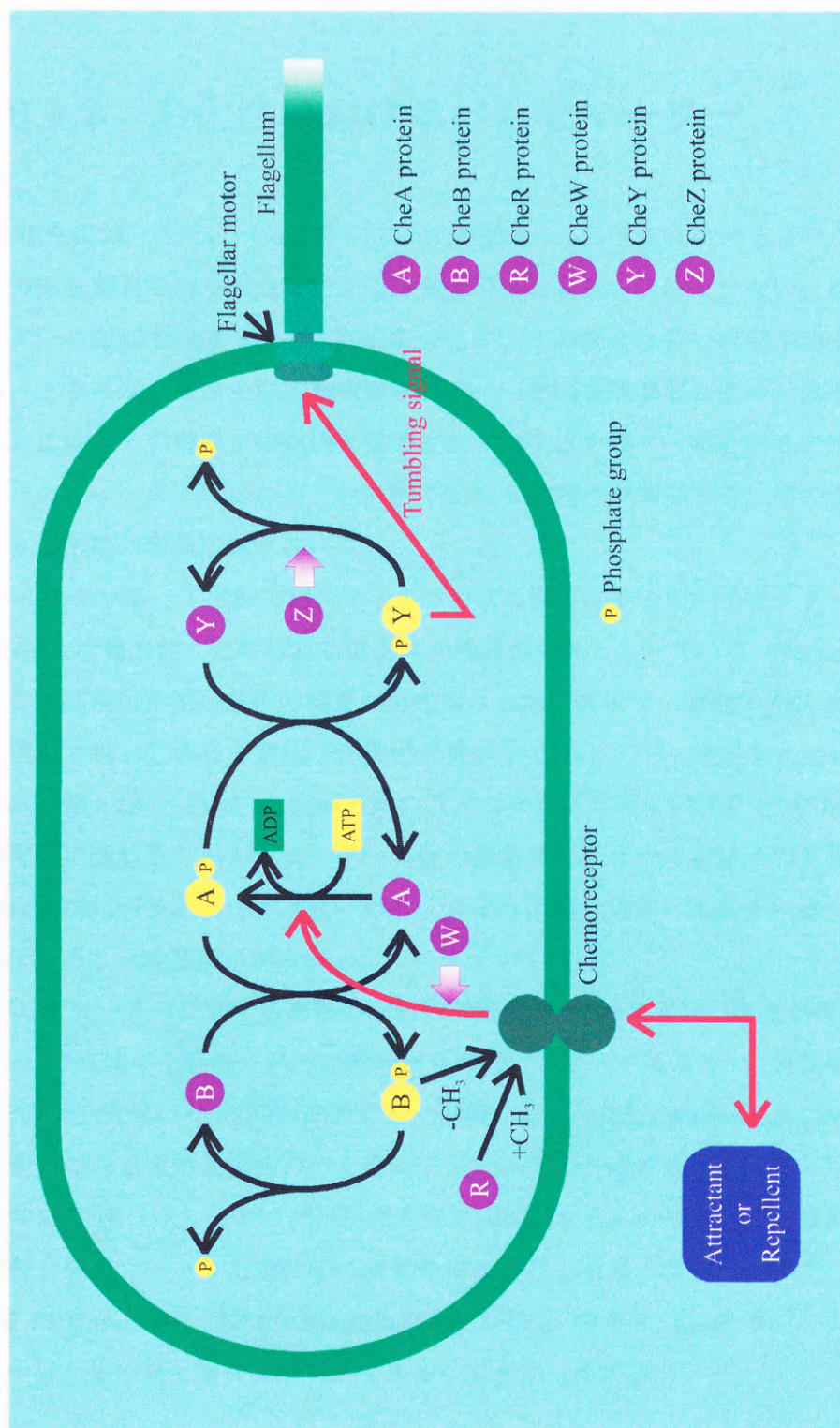


図35 細菌の走化性システムの概念図。

化学受容体に誘因物質（あるいは忌避物質）が結合すると、細胞内の Che タンパク質のリン酸化レベルが変化し、最終的にべん毛モーターの回転方向変換の頻度が変わる。

6.1.2 走化性におけるべん毛モーター

走化性においては、べん毛モーターの役割は、トルクを発生することよりも、回転方向を変えるほうが重要である。細菌が何の刺激も受けていないときには、べん毛モーターの回転方向はランダムに反転するが、その割合は長い時間平均すると一定している。ところが、細菌が忌避物質濃度の高い（誘因物質濃度の低い）ほうへ向かっているときには、その情報が細胞内の信号変換システムを経て、時計回りに回転する信号としてべん毛モーターに伝わり、時計回り回転する割合が増加する。逆の場合には、反時計回り回転の割合が増加する。

べん毛モーターの回転方向のスイッチングに深く関わっているモーターの部品として、「スイッチ複合体」と呼ばれる概念上の構造体が考えられている（Yamaguchi et al., 1986b）。これは遺伝学的な解析の結果から提案された構造体で、遺伝子 *fliG*, *fliM*, *fliN* の産物から構成され、これらの遺伝子に突然変異が生じると、べん毛が生えない（*Fla⁻*）、モーターが回転しない（*Mot⁻*）、回転方向のスイッチングに異常が生じる（*Che⁻*）という三つの表現型が現れる。べん毛モーターの他の部品ではひとつの遺伝子の変異でこのような多様な表現型が現れることはないので、スイッチ複合体がべん毛モーターの中核をなす部品であることは間違いない。

べん毛モーターに対する直接の回転方向信号は、CheY タンパク質が担っている。CheY タンパク質はべん毛モーターに時計回りの回転を指令する信号で、野生株からこれを除くとべん毛モーターは反時計回りにしか回転しなくなる¹（Wolfe et al., 1987）。*cheY* 遺伝子に変異のある突然変異株のべん毛モーターは反時計回りにしか回転しないが、その復帰突然変異²株（べん毛モーターが両方向に回転できる）の中には元の変異のほかにスイッチ複合体をコードする遺伝子に変異を持つものも数多く含まれていた（Parkinson et al., 1979; Parkinson et al., 1983; Yamaguchi et al., 1986b）。つまり、CheY タンパク質の変異をスイッチ複合体の新たな変異が補正できることを示している。

¹ べん毛モーターが反時計回りしかしなくなると、細菌はタンブリングをせずにスムーズに遊泳するだけになる。

² 復帰突然変異：元の突然変異体からもう一度突然変異が起こって、野生株の表現型に戻る。元の突然変異が直ることもある（真の復帰突然変異）し、第2の突然変異が起こって元の突然変異を補うこと（偽復帰突然変異、あるいはサプレッサー突然変異）もある。

本章では、べん毛モーターの回転方向スイッチ機能におけるスイッチ複合体の役割を CheY タンパク質との相互作用の面から、遺伝学的・行動学的な手法を用いて調べ、べん毛モーターのスイッチが持つ性質を明らかにすることを目的とする。

6.2 材料と方法

6.2.1 培地、溶液

本章で使用した培地、溶液の組成は表 18 にまとめた。

表 18 培地、溶液の組成。

培地、溶液名	組成
液体培地	1.0% polypeptone, 1.0% meat extract, (adjust pH to 7.0)
固形培地	液体培地 + 1.5% agar
半流動培地	液体培地 + 0.3% agar, 8.0% gelatin
観察溶液	10 mM KH_2PO_4 , 20 mM KCl, (adjust pH to 7.0 with KOH)
誘因物質溶液	観察溶液 + 0.1 mM serine
忌避物質溶液	観察溶液 + 10% glycerol

6.2.2 細菌株

本章の研究で使われたすべての細菌株は *S. typhimurium* SJW1103 (Yamaguchi et al., 1984) 由来である。本節の研究で使用された細菌株の中で、以前に単離された細菌株は表 19 のとおりである。

表19 研究に使われた *S. typhimurium* の細菌株。

細菌株	遺伝子型	表現型	入手源
SJW1103	wild type	wild type	S. Yamaguchi (1)
SJW2323	<i>fliG</i> -5	not smooth	S. Yamaguchi (2)
SJW2339	Δ (<i>fliE</i> - <i>fliN</i>)	no flagella	S. Yamaguchi (3)
SJW2903	<i>cheY</i> -4	smooth	S. Yamaguchi (2)

(1) Yamaguchi et al., 1984; (2) Yamaguchi et al., 1986b; (3) Yamaguchi et al., 1986a

6.3 結果

6.3.1 復帰突然変異体の分離

CheY タンパク質とスイッチ複合体の相互作用を調べるために、*cheY* 突然変異体からの復帰突然変異として、多数のスイッチ突然変異体を分離した。

まず、変異部位の異なる 10 株の *cheY* 突然変異体を分離した (図 36)。半流動培地上であまり広がらない細菌株の中から、液体培地中で遊泳方向を変えないものを選択し、変異部位をマッピングした。SJW3064 は野生株 (SJW3076) から自然発生したものだが、他の株は *fliG* あるいは *fliM* スwitch突然変異体のサプレッサー変異として *cheY* 突然変異を単離したものである。これらの *cheY* 突然変異体を液体培地で培養し、10 μ l を半流動培地上に線状に塗布した。37°C で一日から三日培養したあと、自然発生した復帰突然変異体を分離した (図 37)。その中のサプレッサー突然変異体の第二の変異部位を大まかにマッピングした (表 20) ところ、サプレッサー変異部位の約半分は *che* 遺伝子群にマッピングされ、そのほとんどが *cheY* 遺伝子であった。残りは、*cheZ* や *cheA* 遺伝子などにマッピングされた。*che* 遺伝子群以外の変異はすべてスitch遺伝子 (*fliG*, *fliM*, *fliN*) にマッピングされた。親株の *cheY* 突然変異体によって、サプレッサー変異部位がスitch

チ遺伝子に多いか *che* 遺伝子群に多いかが異なっていた。なお、マッピングの方法は Yamaguchi et al. (1986a)に従った¹。

スイッチ遺伝子に変異のあるものだけを 50 ずつランダムに抽出し、詳細にマッピングした (図 38)。変異部位は均等に分布しているのではなく、極端にかたよっていた。特に、*fliM-5*, *fliM-6* にはそれぞれ 125、144 株がマッピングされ、全体の半分以上を占めた。親株によってサプレッサー変異部位の分布に差があり、この分布の差は *fliM-5* に多いか *fliM-6* に多いかに特徴的に現れていた。

サプレッサー変異の部位がスイッチ遺伝子に多く発生する *cheY* 突然変異体は *fliM-5* よりも *fliM-6* にサプレッサー変異を多く生じる傾向があり、*che* 遺伝子群に多く生じるものは *fliM-5* のサプレッサー変異が多かった (図 39)。前者をタイプ 1、後者をタイプ 2 とすると、タイプ 1 に属する突然変異体は SJW2903, SJW3064, SJW3066, SJW3068, SJW3069 であり、タイプ 2 に属するものは SJW2906, SJW3062, SJW3063 であった。SJW2905 と SJW2908 はその中間的な性質を持っていた。

表20 *cheY* 突然変異体のサプレッサー突然変異部位の大まかなマッピング。

親株 (<i>cheY</i> 突然変異体)	サプレッサー 変異体の数	サプレッサー変異部位	
		スイッチ遺伝子	<i>che</i> 遺伝子
SJW2903	133	50	83
SJW2905	89	61	28
SJW2906	84	63	21
SJW2908	91	53	38
SJW3062	74	69	5
SJW3063	72	68	4
SJW3064	184	52	132
SJW3066	162	56	106
SJW3068	178	56	122
SJW3069	158	50	108

¹ 欠失部位の異なる多数の標準突然変異体を用いて、決定したい突然変異がどの欠失部位にあるかを定める方法。遺伝子だけでなく、遺伝子の中のさらに細かな部位 (セグメント) まで決定できる。この方法によって、突然変異の部位は、例えば、*fliM* 遺伝子の第 5 セグメントというように決定され、「変異部位は *fliM-5* である」と表現される。

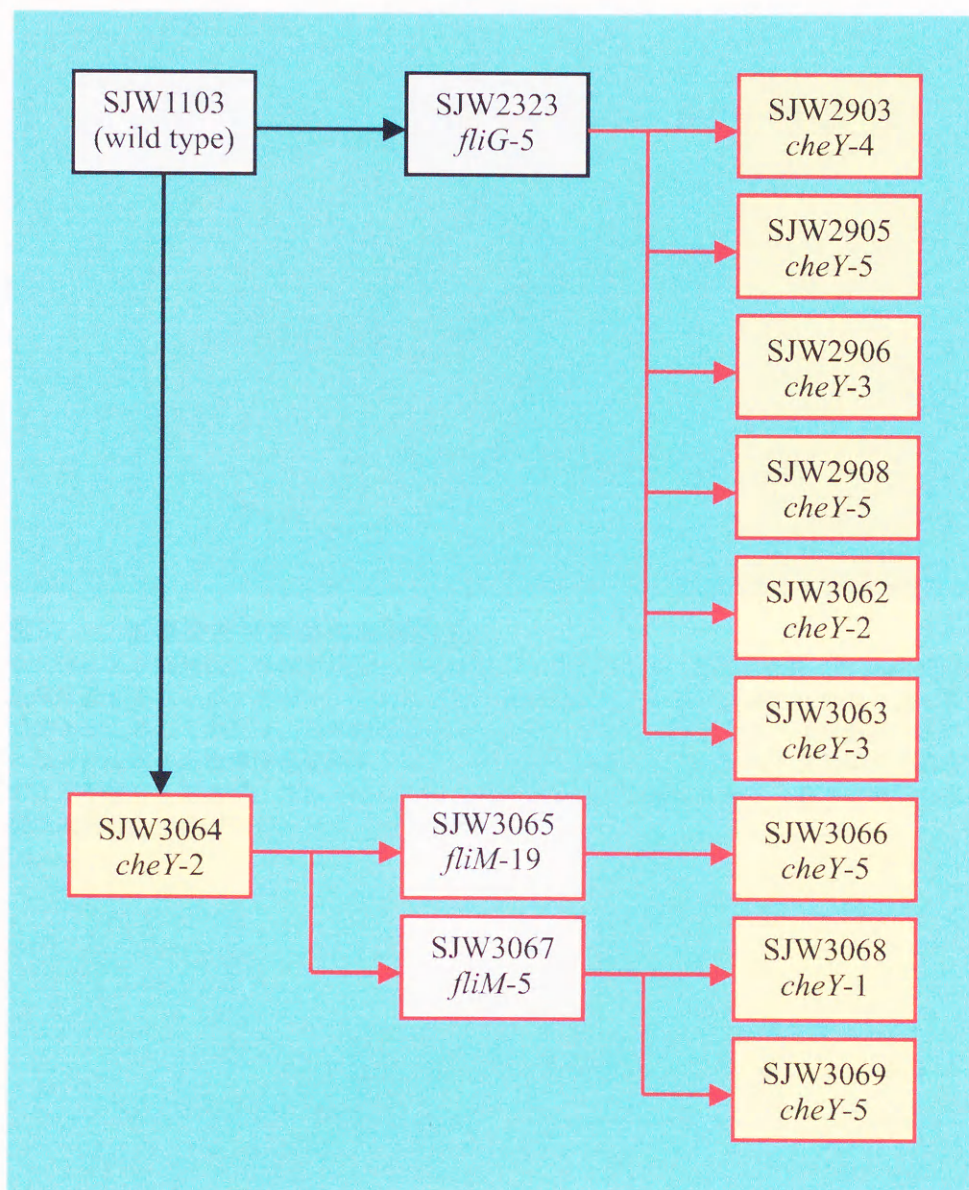


図36 *cheY* 突然変異体の系統。

上段が菌株番号、下段が変異部位である。黄色で示した細菌株が、親株として使われた *cheY* 突然変異体である。赤い線は本研究の実施範囲を示している。

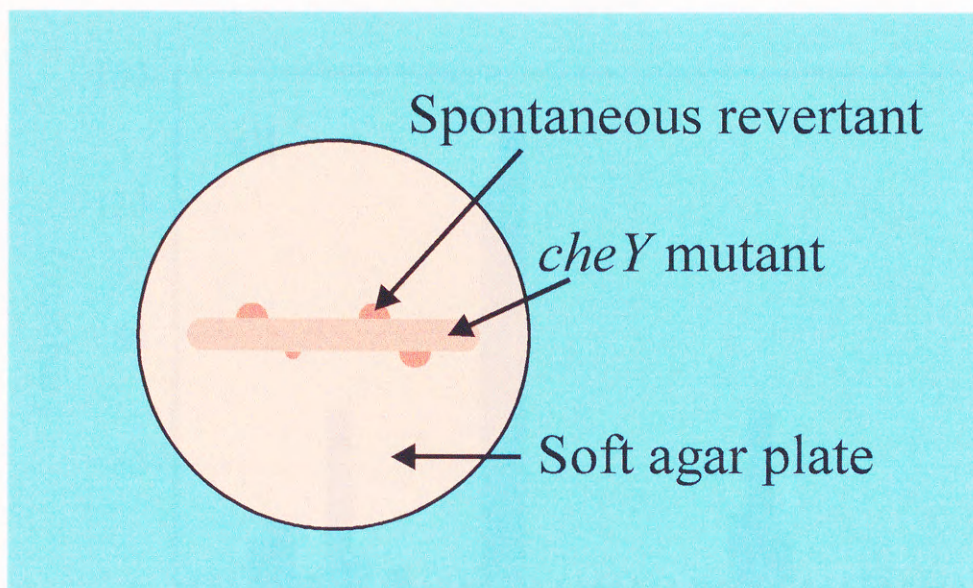
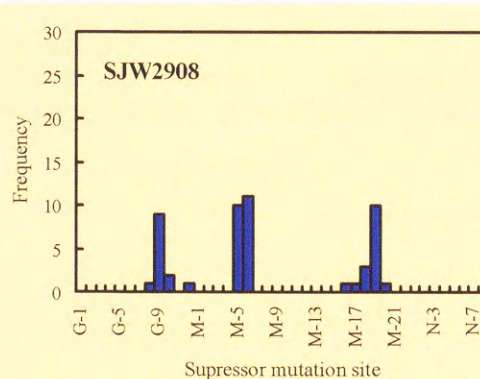
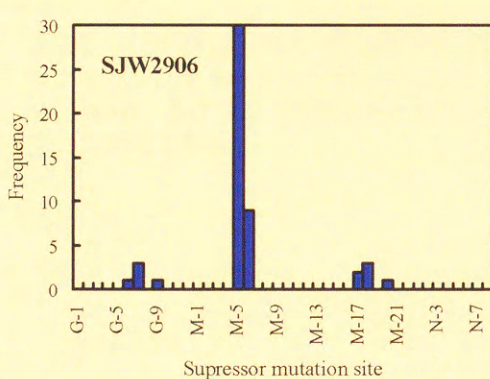
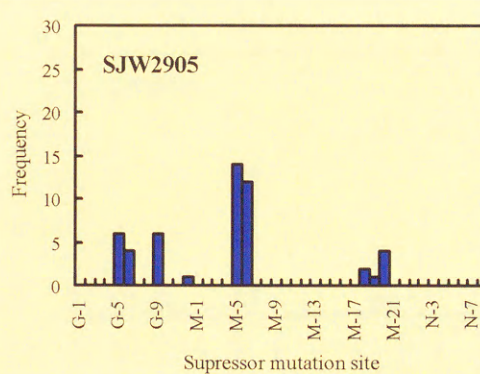
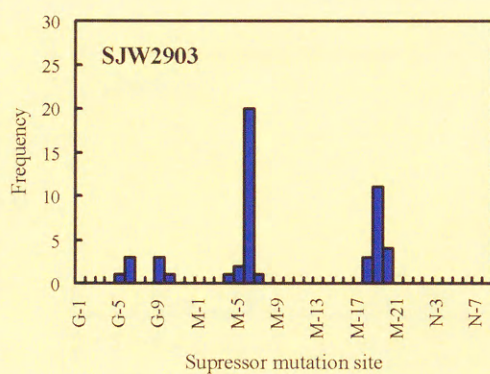
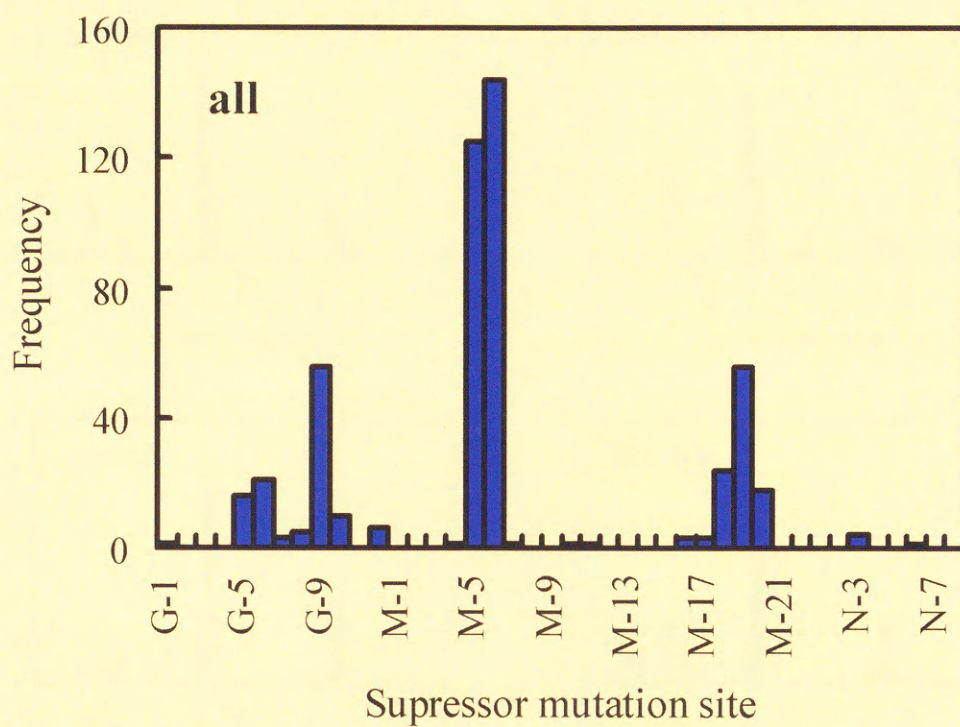


図37 復帰突然変異体の分離方法。

走化性のある細菌株は半流動培地上で拡がることができるが、走化性を失った *cheY* 突然変異体は拡がることできない。しかし、数日培養を続けていると、走化性を取り戻す突然変異が起こることがあり、その変異株は元のコロニーからしみ出すように拡がる。このような突然変異体を復帰突然変異体と言う。復帰突然変異には、元の *cheY* 遺伝子の変異を正常に戻す場合もあるが、それとは別の第二の変異が起こる場合もある。前者は単純な復帰突然変異で、後者がサプレッサー突然変異である。



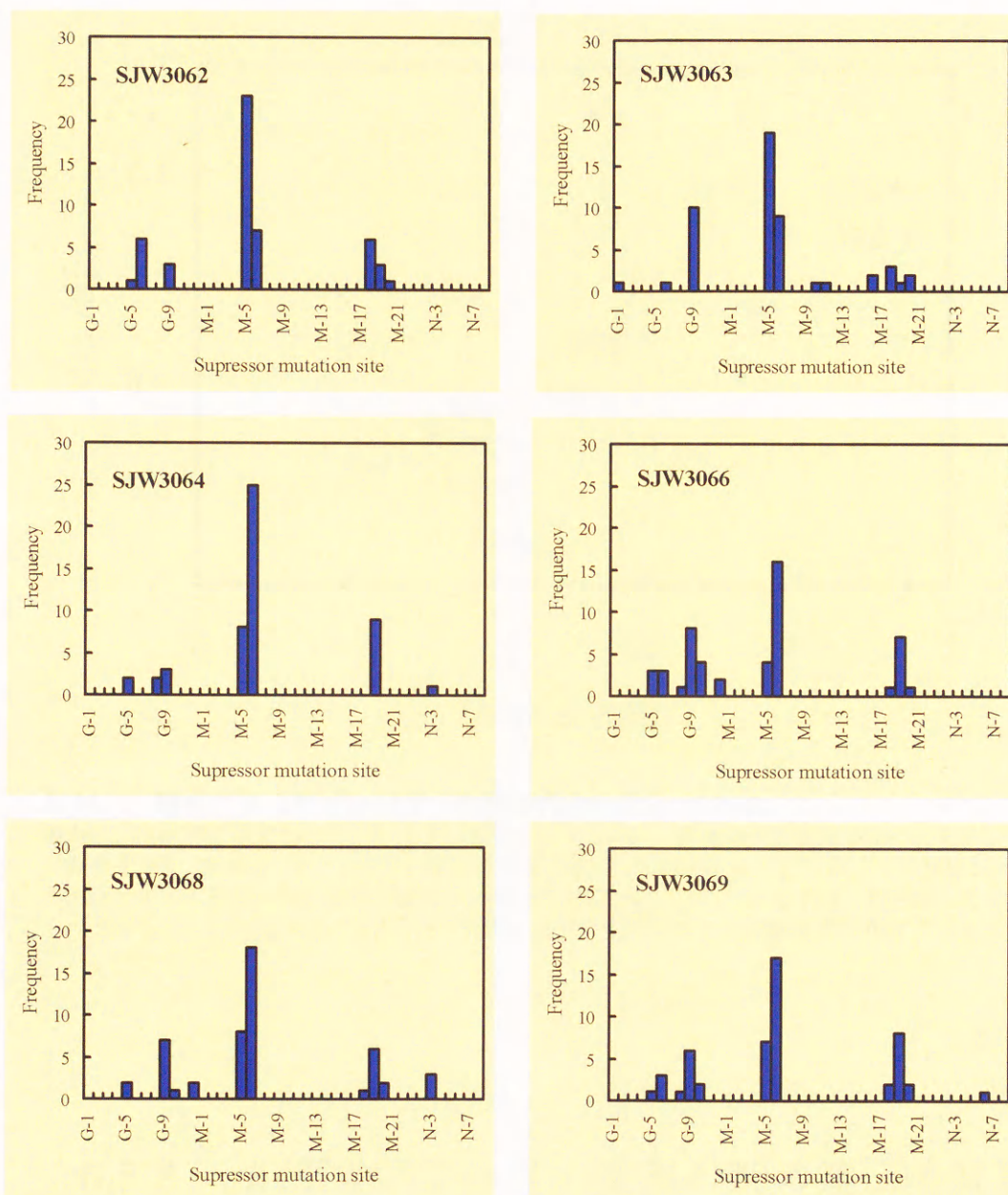


図38 サプレッサー変異部位の詳細なマッピング。

サプレッサー変異部位は欠失突然変異体による補完テストによって決定した (Yamaguchi et al., 1986a)。各グラフの細菌株名は親株の *cheY* 突然変異体を示す。all は 500 株すべてを総合した結果である。

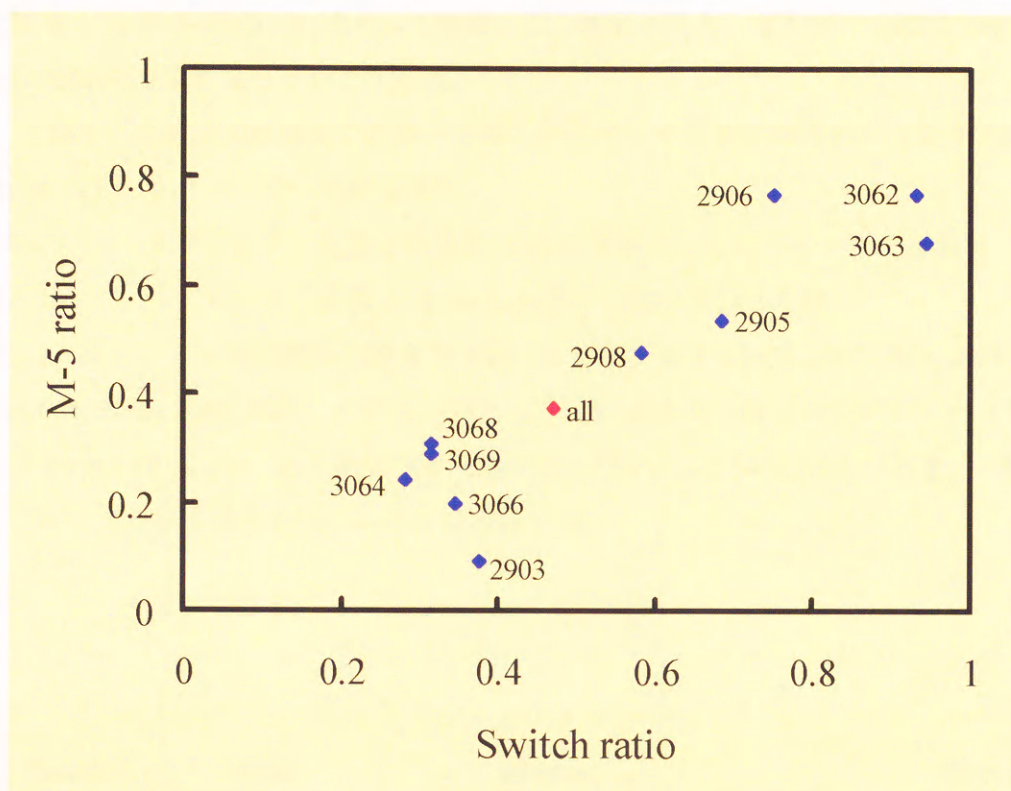


図39 親株によるサプレッサー変異部位のかたよりの違い。

横軸は、*cheY* 突然変異体のサプレッサー変異体のうちスイッチ遺伝子に変異があったものの割合を表す。縦軸は、サプレッサー変異部位が *fliM-5* と *fliM-6* にあったもののうち *fliM-5* の割合を表す。各点の横の番号は親株の *cheY* 突然変異体を示す。all はすべてを合計したものである。このふたつのパラメーターの間には強い相関があり、相関係数は 0.92 であった。

6.3.2 *cheY* サプレッサー変異の別の遺伝的背景への遺伝子導入

これらのサプレッサー突然変異体の表現型は、*cheY* 遺伝子の変異とスイッチ遺伝子の変異の総合された結果である。スイッチ遺伝子の変異そのものの影響を比較するために、変異スイッチ遺伝子を2種類の共通な *cheY* 遺伝子の遺伝的背景に導入した。ひとつは野生株の *cheY* 遺伝子、もうひとつは *che* 遺伝子群を欠失したものである。それぞれのスイッチ突然変異をふたつの無べん毛突然変異体 SJW2339 ($\Delta(fliE-fliN)$) と SJW3077 ($\Delta(fliE-fliN)$, $\Delta(cheA-cheZ)$) に導入した (図 40)。ここで、SJW3077 は SJW2339 の欠失を

SJW3076 ($\Delta(\text{cheA-cheZ})$) に導入して構築した。遺伝子導入と導入体の分離は Yamaguchi et al. (1986a)の方法に従っておこなった。

以下、表記上の簡便化のため、作製したスイッチ突然変異体を次のように表す。

$\text{Sw}_n(\text{CheY}_m)$: サプレッサー突然変異体

$\text{Sw}_n(\text{CheY}^+)$: サプレッサー変異と野生株の *cheY* 遺伝子とを組み合わせた細菌株

$\text{Sw}_n(\Delta\text{Che})$: サプレッサー変異と $\Delta(\text{cheA-cheZ})$ とを組み合わせた株

ただし、*n* はスイッチ突然変異の番号 (1-500)、*m* は親株番号 (2903, 2905, 2906, 2908, 3062, 3063, 3064, 3066, 3068, 3069) である。例えば、SJW2903 の 1 番目のサプレッサー突然変異体は $\text{Sw}_1(\text{CheY}_{2903})$ で、その遺伝子導入体は $\text{Sw}_1(\text{CheY}^+)$ と $\text{Sw}_1(\Delta\text{Che})$ である。一般的にそのグループを表す場合には、*n* と *m* は省略する。

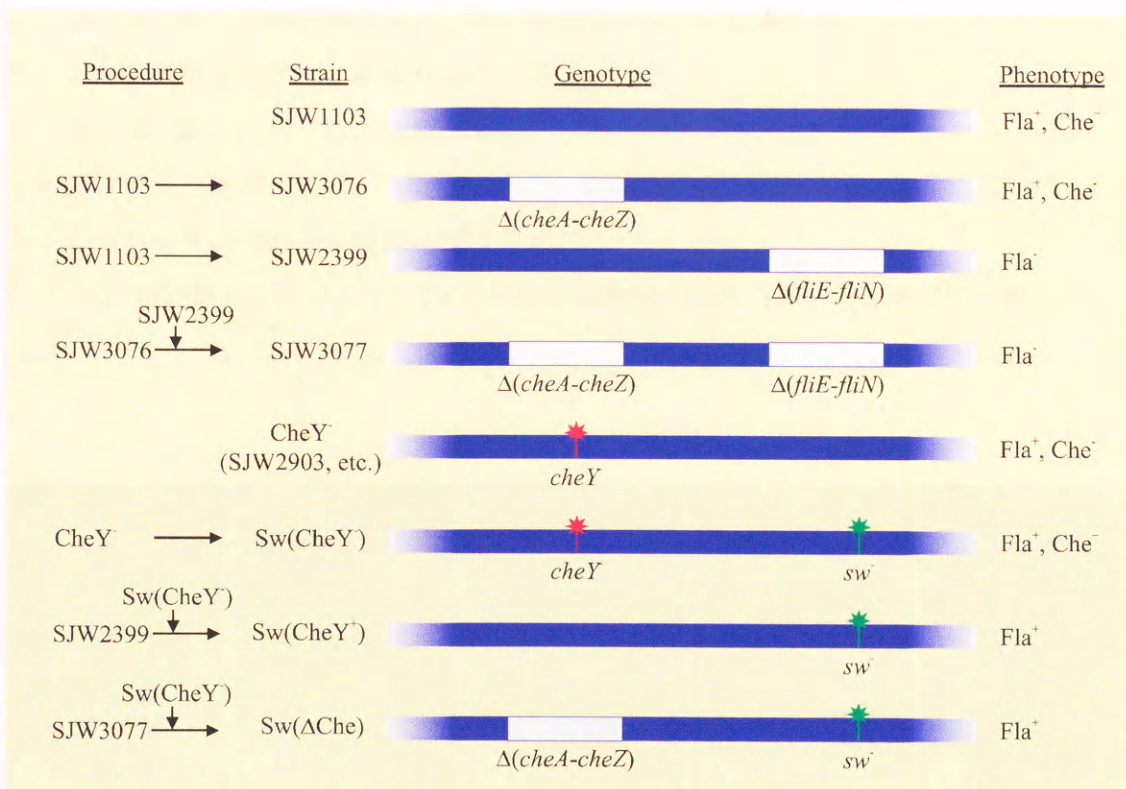


図40 *cheY* サプレッサー変異の別の遺伝的背景への遺伝子導入。

ここで目的とする細菌株 (下の2段) は、サプレッサー突然変異体 (下から3段目) に感染した P22 ファージを用いて SJW2399 あるいは SJW3077 に遺伝子導入することによって得られる。遺伝子導入と遺伝子導入体の分離は基本的に Yamaguchi et al. (1986a)の方法を採用した。

6.3.3 遊泳パターン分類

スイッチ遺伝子の突然変異の回転方向スイッチングに及ぼす影響を調べたいので、理想的にはテザードセルを用いてスイッチング頻度と回転方向の偏りを測定すべきかもしれない。しかし、1500 すべての突然変異体を調べなければならないこと、個体差を考慮すると一変異体当たり最低 10 細胞は調べなければならない、という点から、自由に遊泳している細菌の遊泳パターン进行分类することにした。この方法は主観的ではあるが、顕微鏡視野内に多数の個体が同時に存在し、そのパターンを平均して判断することになるので、多数の変異体の間の比較にはかえって向いていると考えられる。

遊泳パターンは次のように 1 から 5 までの 5 段階に分類した (図 41)。

1. 遊泳方向を変えない。
2. 野生株のような遊泳パターン。
3. 野生株よりも方向転換が多く、飛び跳ねているように見える。
4. 方向転換が多すぎて、あまり遠くまで動かない。
5. ゆっくり動き、たまに方向転換する。

この遊泳パターンの分類は、べん毛モーターの時計回り回転の割合に対応していた。1 から 5 に向かって、時計回り回転の割合が高い。

この分類にしたがって、1500 の突然変異体の遊泳パターンをすべて分類した。

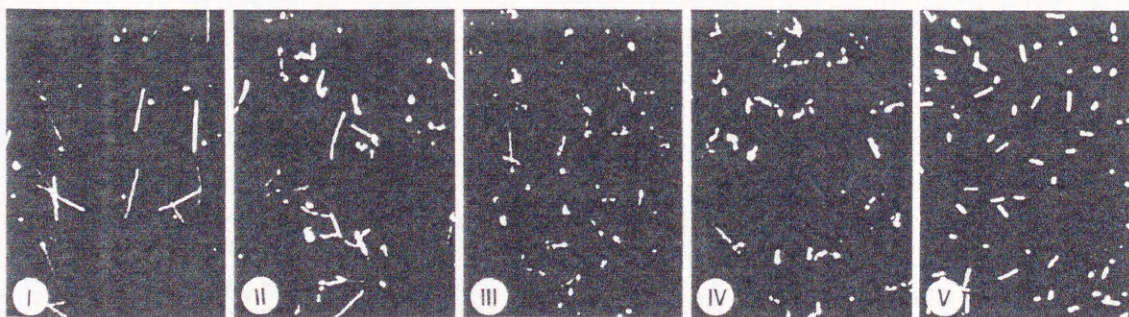


図41 遊泳パターンの5段階の分類。

1 秒間の遊泳の軌跡を示した。パターン 1 では、細菌は進行方向を変えないので、軌跡はまっすぐに伸びている。パターン 2 から 4 に向かって、進行方向を変える頻度がしだいに高くなるため、軌跡の長さが短く不規則になる。パターン 5 はほとんど進行方向を変えないが、遊泳速度がきわめて小さい。

表21 スイッチ突然変異体の遊泳パターン (例)。

No.	Parent	<i>cheY</i> site	Sw. site	Swimming pattern		
				Sw(CheY ⁻)	Sw(CheY ⁺)	Sw(Δ Che)
1	SJW2903	4	M-19	2	3	1
2	SJW2903	4	M-6	3	4	1
3	SJW2903	4	M-20	2	3	1
4	SJW2903	4	M-18	2	3	1
5	SJW2903	4	M-19	2	3	1
6	SJW2903	4	M-19	2	3	1
7	SJW2903	4	M-6	2	3	1
8	SJW2903	4	M-6	2	3	1
9	SJW2903	4	M-6	3	3	1
10	SJW2903	4	M-6	3	4	1
11	SJW2903	4	M-20	3	4	2
12	SJW2903	4	M-5	3	4	3
13	SJW2903	4	M-18	2	3	1
14	SJW2903	4	M-6	2	3	1
15	SJW2903	4	M-6	2	3	1
16	SJW2903	4	G-6	1	2	1
17	SJW2903	4	M-6	1	2	1
18	SJW2903	4	M-19	2	4	1
19	SJW2903	4	G-6	2	3	1
20	SJW2903	4	M-6	3	3	1
21	SJW2903	4	M-19	3	4	1
22	SJW2903	4	M-4	2	3	1
23	SJW2903	4	M-6	2	3	1
24	SJW2903	4	M-20	2	3	1
25	SJW2903	4	M-19	2	4	1
26	SJW2903	4	G-9	1	2	1
27	SJW2903	4	M-6	2	3	1
28	SJW2903	4	M-19	2	3	1
29	SJW2903	4	G-9	2	3	1
30	SJW2903	4	G-10	3	3	1
31	SJW2903	4	M-6	3	3	1
32	SJW2903	4	M-6	3	3	1
33	SJW2903	4	M-7	2	3	1
34	SJW2903	4	M-6	3	3	1
35	SJW2903	4	G-9	1	2	1
36	SJW2903	4	M-20	3	4	2
37	SJW2903	4	M-18	2	3	1
38	SJW2903	4	M-6	2	3	1
39	SJW2903	4	M-6	2	4	1
40	SJW2903	4	M-6	3	3	1
41	SJW2903	4	G-6	2	2	1

42	SJW2903	4	M-19	2	3	1
43	SJW2903	4	M-6	3	3	1
44	SJW2903	4	M-6	3	4	1
45	SJW2903	4	M-6	1	3	1
46	SJW2903	4	G-5	1	2	1
47	SJW2903	4	M-5	3	3	2
48	SJW2903	4	M-19	1	3	1
49	SJW2903	4	M-19	1	3	1
50	SJW2903	4	M-19	2	3	1

左の列から、スイッチ突然変異の番号、親株名、親株の変異部位、スイッチ変異の部位、3つの遺伝的背景の異なるスイッチ突然変異体の遊泳パターンである。

6.3.4 遊泳パターンと変異部位

スイッチ突然変異がべん毛モーターの回転方向スイッチにどのように影響しているのかを明らかにするために、スイッチ突然変異体の遊泳パターンによって整理した。

親株の *cheY* 突然変異体はすべてスムーズに遊泳した（遊泳パターン 1）が、そのサブレッサー突然変異体やスイッチ変異を別の遺伝的背景に導入した株の遊泳パターンは多様であった（図 42）。

個々のスイッチ変異と遺伝的背景の関係は図 43に示した。一般的に、 $Sw_n(\text{CheY})$ よりも $Sw_n(\text{CheY}^+)$ のほうが進行方向を変える頻度が高かった（遊泳パターンの数字が大きい）。逆に、 $Sw_n(\Delta\text{Che})$ は7割近くが遊泳方向を変えず（遊泳パターン 1）、そうでないものもほとんどが $Sw_n(\text{CheY})$ よりも進行方向を変える頻度が低かった（遊泳パターンの数字が小さい）。しかし、 $Sw_n(\Delta\text{Che})$ は細胞内の走化性信号伝達システムをすべて欠失しているのに、進行方向を変える、つまりべん毛モーターの回転方向を変えるものがあつたことは驚きであつた。

$Sw_n(\text{CheY}^+)$ の遊泳パターンと $Sw_n(\Delta\text{Che})$ の遊泳パターンとの間関係にはふたつのタイプがあるように見える（図 44 All）。すなわち、 $Sw_n(\text{CheY}^+)$ の遊泳パターンに関わらず $Sw_n(\Delta\text{Che})$ の遊泳パターンは1となるタイプ（タイプ1）と、 $Sw_n(\Delta\text{Che})$ は $Sw_n(\text{CheY}^+)$ よりも少し進行方向を変える頻度が少ないタイプ（タイプ2）である。興味深いことに、サブレッサー変異部位によって分類した *cheY* 突然変異体（タイプ1：SJW2903, SJW3064, SJW3066, SJW3068, SJW3069；タイプ2：SJW2906, SJW3062, SJW3063；中間：SJW2905,

SJW2908) を親株とするスイッチ突然変異体は、この分類とよく一致していた (図 44 Type1, Type-2, Type-12)。

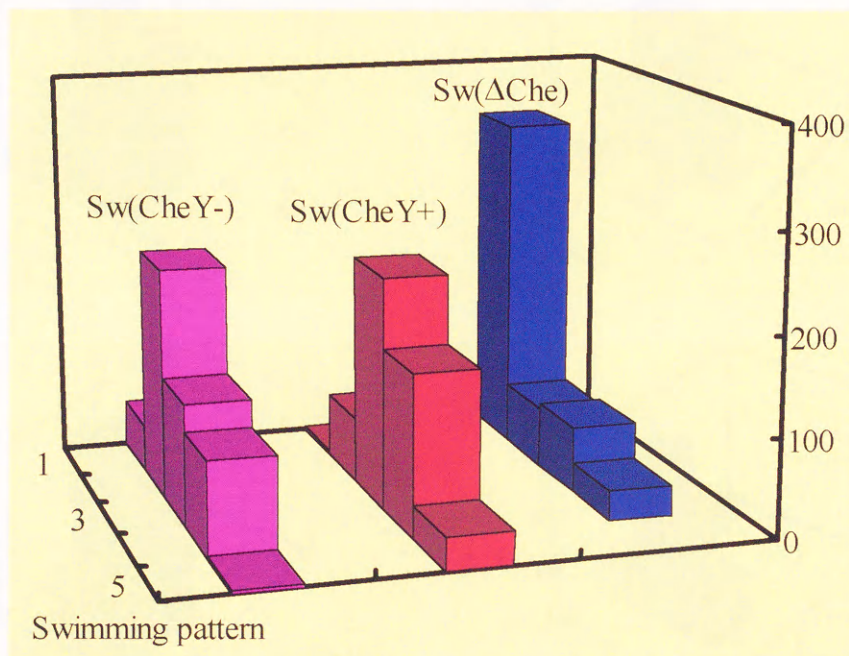


図42 スイッチ突然変異体の遊泳パターン。

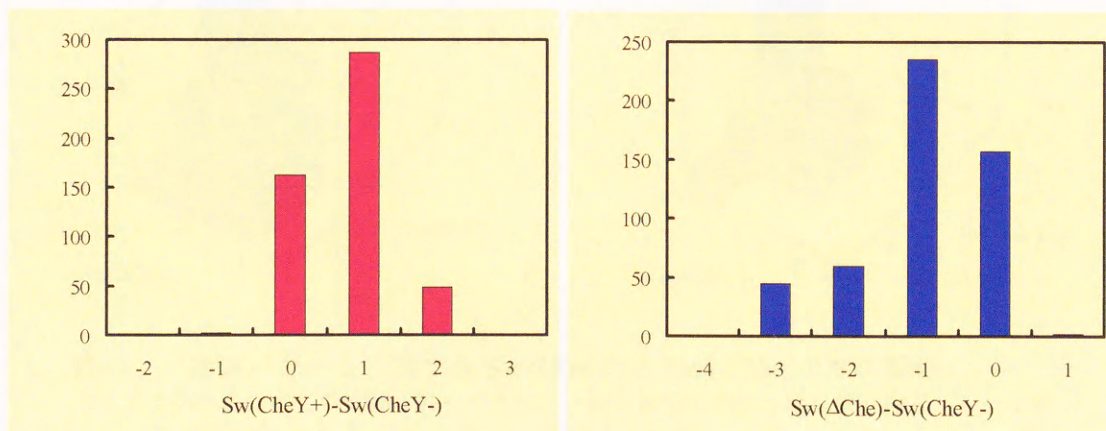


図43 遊泳パターンに対する遺伝的背景の及ぼす影響。

サプレッサー突然変異体 (Sw(CheY⁻)) の遊泳パターンを基準に、Sw(CheY⁺) と Sw(ΔChe) の遊泳パターンがどれだけずれたかを示している。

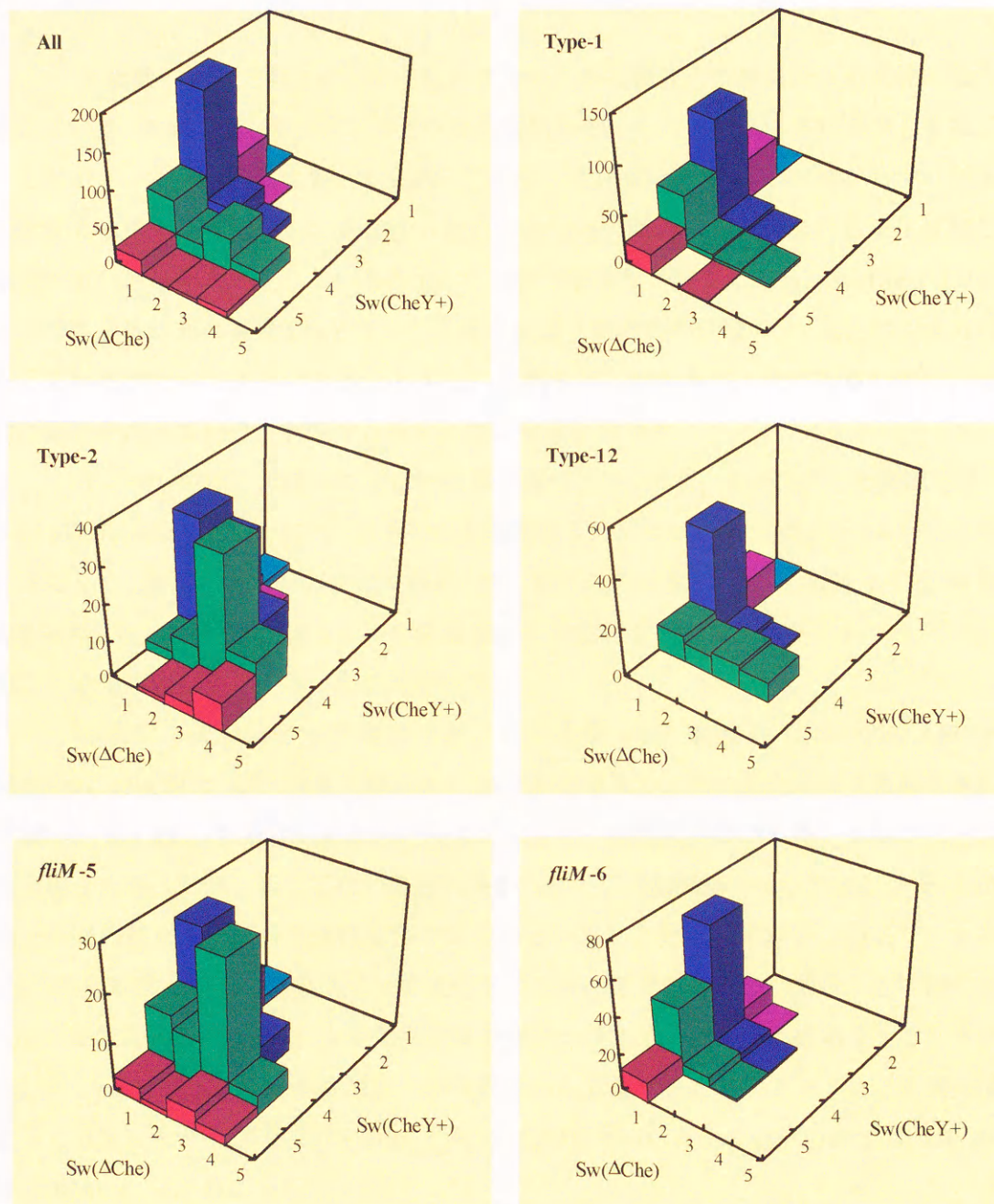


図44 遊泳パターンに関する $Sw(CheY^+)$ と $Sw(\Delta Che)$ の間の関係。
 スイッチ突然変異固有の性質を調べるために、同じ遺伝的背景を持つ細菌株どうし、つまり $Sw(CheY^+)$ と $Sw(\Delta Che)$ の遊泳パターンの関係を示した。

6.3.5 対立遺伝子特異性

半流動培地上でのコロニーの拡がり方は、ある程度その細菌株の走化性の能力を表している。Sw(CheY⁻)はサプレッサー突然変異体そのものであり、当然多少とも拡がることができ、走化性応答の能力も保持していた。Sw(Δ Che)はほとんど拡がらず、遊泳方向を変える能力はあっても、走化性の能力はないと判断された。細胞内の走化性信号を伝達するシステムを欠失しているため、これは予想された結果である。Sw(CheY⁺)ではスイッチ複合体が親の変異 CheY タンパク質とは違う組み合わせなので、走化性の能力は欠失しているという予想もできる。しかし、これらは、拡がり方に差はあるものの、走化性の能力を持っていると判断せざるをえない結果となった。

そこで、もっと直接的に走化性応答を調べた。つまり、Sw(CheY⁺)を誘因物質（セリン；Hedblom and Adler, 1983）あるいは忌避物質（グリセロール；Oosawa and Imae, 1983）にさらして、遊泳パターンの変化を観察した。調べたのは SJW2908 を親株とする 50 株である（表 22）。この結果、ほとんどの細菌株が走化性応答をすることがわかった。ただし、中には走化性応答を示さないものがあった。

さらに、変異スイッチ遺伝子をさまざまな *cheY* 遺伝子（SJW2903, SJW2905, SJW2906, SJW2908, SJW3062, SJW3063）の背景に導入し、その走化性を半流動培地により調べた（表 23）。もちろんもとのサプレッサー突然変異体がもっとも拡がり方が大きい場合もあったが、そうでない場合も多かった。この結果はスイッチ遺伝子と *cheY* 遺伝子の間の対立遺伝子特異性は厳密ではないということを示している。つまり、もとの *cheY* 突然変異を補完できるスイッチ遺伝子の変異は必ずしもひとつであるとは限らないこと、また逆にさまざまな *cheY* 突然変異をひとつのスイッチ変異が補完できることが示された。*cheY* 遺伝子の突然変異をこの特異性から分類すると、サプレッサー変異部位によって分類したタイプ 2（SJW2906, SJW3062, SJW3063）とその他（SJW2903, SJW2905, SJW2908）に分けることができた。

表22 Sw(CheY⁺)の走化性応答 (例)。

Strain	Mutation site	+Attractant	No addition	+Repellent
SJW1103	Wild type	1	2	3
Sw ₃ (CheY ⁺)	<i>fliG</i> -9	2	3	4
Sw ₂₂ (CheY ⁺)	<i>fliM</i> -5	3	4	4
Sw ₂₇ (CheY ⁺)	<i>fliM</i> -6	2	3	4
Sw ₃₉ (CheY ⁺)	<i>fliM</i> -18	4	4	4
Sw ₄₂ (CheY ⁺)	<i>fliM</i> -19	1	2	3

誘因物質としてセリン、忌避物質としてグリセロールを使用した。

表23 スイッチ遺伝子と *cheY* 遺伝子の対立遺伝子特異性。

switch gene	<i>cheY</i>						
	wild type	SJW2903	SJW2905	SJW2908	SJW2906	SJW3062	SJW3063
wild type	<u>60</u>	4	4	4	4	4	4
2908-28	14	38	34	<u>36</u>	10	8	7
2905-19	5	35	<u>38</u>	26	7	7	6
3062-47	8	36	39	31	11	9	7
2903-39	5	<u>34</u>	23	31	5	5	5
2908-47	6	35	39	<u>23</u>	11	8	7
2903-38	6	<u>33</u>	23	27	5	5	5
2905-48	7	29	<u>29</u>	23	6	6	5
3063-34	5	30	23	23	10	7	<u>8</u>
2906-42	4	27	20	22	9	11	11
2903-11	6	<u>22</u>	21	20	18	6	7
2908-23	10	8	8	<u>7</u>	11	8	8
2905-16	5	11	<u>12</u>	7	18	9	9
3062-25	6	9	6	5	15	<u>7</u>	7
2906-17	4	10	11	9	<u>26</u>	13	13
3062-33	7	8	11	7	21	<u>15</u>	12
2906-46	5	8	10	7	<u>28</u>	14	14
3063-2	4	7	12	7	23	16	<u>18</u>
3063-25	4	7	8	6	22	16	<u>17</u>

スイッチ遺伝子と *cheY* 遺伝子の組み合わせによる走化性の違いを、半流動培地上のコロニーの拡がり方で調べた。数字がコロニーの直径 (mm) で、11-20 mm を緑、20 mm 以上を赤で示した。下線で示した株がサプレッサー突然変異体である。良好な走化性応答を示す組み合わせをグループ化し、黄色の網かけで示した。

6.4 考察

6.4.1 スイッチ突然変異のふたつのグループ

本章の研究では、スイッチ突然変異を *cheY* 突然変異のサプレッサー変異として選択した。ところが、親株である *cheY* 突然変異体によって生じやすいサプレッサー部位に大きな違いがあった。生じやすいサプレッサー変異がスイッチ遺伝子の場合には *fliM-6* よりも *fliM-5* にかたよっている（タイプ2）のに対して、スイッチ遺伝子にあまりサプレッサー変異が生じない場合には *fliM-6* のほうが多かった（タイプ1）（図39参照）。このグループ分けはスイッチ突然変異体の遊泳パターンとも強い相関があった。つまり、スイッチ突然変異に関して、Sw(CheY⁺)と Sw(Δ Che)の遊泳パターンの関係から、ふたつのグループが存在すると考えられた。ひとつは Sw(CheY⁺)の遊泳パターンに関わらず Sw(Δ Che)の遊泳パターンは1を示すグループで、もうひとつは Sw(Δ Che)の遊泳パターンが Sw(CheY⁺)の遊泳パターンよりも1段階程度スムーズ側にかたよっているグループである（図44参照）。前者はタイプ1に、後者はタイプ2によく対応していた。さらに、対立遺伝子特異性を調べた結果は、個々の遺伝子にそれぞれ特異性があるというよりは、ここで分類したタイプごとに特異性があることを示していた（表23参照）。以上の結果をまとめると表24のようになり、スイッチ複合体にはべん毛モーターの回転方向に関して、大きくふたつの機能部位が存在するということを示唆している。

表24 スイッチ突然変異のふたつのタイプ。

	タイプ1	タイプ2
親株	SJW2906, SJW3062, SJW3063	SJW2903, SJW3064, SJW3066, SJW3068, SJW3069
おもな変異部位	<i>fliM-5</i>	<i>fliM-6</i> , <i>fliM-19</i>
Sw(Δ Che)の遊泳	various	1

6.4.2 回転方向を変化させるふたつの部位

スイッチ複合体の回転方向に関するふたつの機能とは何か。スイッチ複合体は回転方向指令信号（リン酸化された CheY タンパク質）を受け取り、べん毛モーターがどちら向きに回転するかを決定する。仮に回転方向指令信号の通りにべん毛モーターの回転方向が決まっているとすると、スイッチ複合体の回転方向に関する機能はひとつしかないと言わざるを得ない。しかし、Sw(Δ Che)のかなりのものがべん毛モーターの回転方向を変えている。この場合、CheY タンパク質は存在しないので、回転方向指令信号は常時反時計方向の回転を指示しているはずである。この場合に、スイッチ複合体が根本的に壊れてしまったのではなく、機構そのものは正常だが内部の調節レベルがおかしくなったのだとすると、スイッチ複合体は何の回転方向指令信号を受けなくともそれ自身で自発的に回転方向を変える機能を持っていると考えられる。ひとつのモデルとして、図 45 のメカニズムを考えることができるだろう。つまり、自発的に回転方向を変えるメカニズムとしてノイズ発生器が存在し、外部からの信号レベルが変化しなくても出力である回転方向は時間とともに変化するようになっている。

このモデルによれば、本研究のスイッチ突然変異体は次のように解釈できる。まず親株である *cheY* 突然変異体はスイッチ複合体に結合すべき信号（CheY タンパク質）に変異を持っているので、信号受容器を経て比較器に入力される信号レベルはゼロかきわめてゼロに近い。野生株のノイズレベルはゼロ付近の大きさの信号には反応しないように調節されているので、回転方向は反時計方向しか出力しない（つまり遊泳パターンはスムーズ）。このような *cheY* 突然変異体のサプレッサー変異としてふたつのケースが考えられる。ひとつは信号受容器に変異が生じ、変異した CheY タンパク質を受け入れ、比較器に正常に近いレベルの信号を伝達できるようになったケースである。この場合、信号タンパク質が欠失した突然変異体（Sw(Δ Che)）では、野生株のスイッチ複合体と同じく、べん毛モーターは反時計方向にしか回転しない。一方、ノイズレベル調整器に変異が生じ、低い信号レベルに適合したケースも考えられる。この場合の Sw(Δ Che)の表現型は、もともと低いレベルに合っているもので、信号がゼロになってもべん毛モーターの回転方向が変動する可能性がある。つまり、前者は実験結果のタイプ 1 に、後者はタイプ 2 に対応している。したがって、ここで考えたモデルは突然変異体の遊泳パターンの観察結果を説明している。さらに、サプレッサー突然変異体が走化性応答を示したこと、

対立遺伝子特異性もふたつにグループ分けできたことなども、このモデルの妥当性を示している。

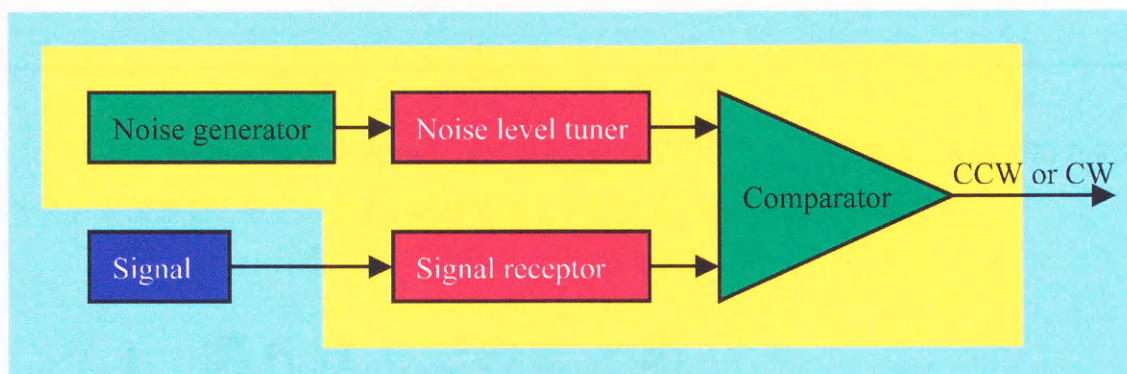


図45 スイッチ複合体の回転方向スイッチのメカニズム（モデル）。
黄色の領域がスイッチ複合体の回転方向スイッチの機能を表す。内部で自発的に発生するノイズと、外部からの信号を比較して、回転方向を決定する。本研究で分離したスイッチ突然変異は、信号受容器かノイズレベル調整器に位置していると考えられる。

6.5 まとめ

べん毛モーターは、細菌の走化性システムのアクチュエーターの役割を果たす、電気化学的エネルギーを力学的エネルギーに変化する生体分子機械であるが、そのメカニズムはまだ解明されていない。しかし、人工の機械とは対照的な、柔軟性といったことばで表すことができるような性質を持っていることは確からしい。本章ではべん毛モーターの回転方向切り替えスイッチに関して研究したが、ここでも柔軟性につながる特性が見られた。つまり、べん毛モーターが外部からの回転方向指令に対して、必ずしも決まった回転方向トルクを出力するのではなく、内部に確率的に回転方向を決める機構が備わっていることを示す結果が得られた。人工の機械工学では、指令に対して必ず決まった応答をするのが理想の機械であると暗黙の了解があったが、生体分子機械はそのような戦略を採っているとは限らないことがひとつ示された。

7 おわりに

第6章までは細菌の運動についての研究をおこなった。本章はこれらの結果を踏まえ、細菌運動の研究の立場から広くマイクロ理工学への展開を考察する。

7.1 第6章までのまとめ

細菌の運動に関してその力学上の性質を明らかにするための研究をおこなった。

まず第2章で、細菌のべん毛型は多様であるが、常に動き続けることが細菌運動の共通の特徴であることを指摘した。このような運動の原動力であるべん毛モーターは、力を発生する生体分子機械の中では複雑な機能を持っている。さらに、細菌が活動の場としている微小世界の力学的環境の特徴を整理した。そこで明らかになったのは、人間が生活しているマクロな世界の力学上の常識が、微小世界では通用しないことが多いということである。特に、力を出すのを止めた瞬間に運動も停止してしまうという点は注目すべきである。

細菌の運動やべん毛モーターの特性をさらに詳細に調べるために、第3章の研究において、べん毛1本の回転を高時間分解能で測定できる方法（レーザー暗視野顕微鏡）を開発した。これにより、これまで一方向にスムーズに回転していると信じられていた Δ Che突然変異体も、急に回転を遅くしたり、一時停止したり、さらには逆転するといった現象が観察された。この現象はスイッチ複合体と密接な関係があると考えられる。

第4章では、レーザー暗視野顕微鏡を用いて単極べん毛細菌 *Vibrio alginolyticus* のべん毛回転数と遊泳速度の関係を調べ、単純なモデルによる理論解析結果と比較した。その結果はよく一致しており、使われたモデルの妥当性が示された。

ところが、第5章で、周べん毛細菌である *Salmonella typhimurium* で同様の研究をおこなってみたところ、束の中のべん毛どうしは流体力学的にきわめて密接に相互作用していると理論的には予想されるにも関わらず、実験結果はそれには合わなかった。つ

まり、古典的な流体力学では無視してきたいくつかの因子、例えば、非定常状態の流体力学や水固有のいくつかの性質（水分子の粒子的な性質、水の構造など）による影響が、ここでは顕著に現れている可能性があると考えられる。

第6章では細菌運動の駆動源であるべん毛モーターの、回転方向を切り替えるスイッチング機能について、多数の突然変異体の挙動を調べるという研究をおこなった。その結果、スイッチに関する突然変異には2種類あり、べん毛モーターの回転方向スイッチは単純に指令どおりに回転方向を切り替えるのではなく、もともと自発的に回転方向を切り替える機能を持っており、指令によりその頻度を調節していることが示唆された。

以上をまとめると、細菌運動の世界には独特の性質がいくつかあり、それらは私たち人間が普段経験できないものであることに気づく。このような性質を見つけだし、使える技術に発展させていくことで、従来の工学に欠けていたものを補えるのではないかと期待している。

7.2 マイクロ理工学への展開

7.2.1 小さいことの有利さ

小さいからこそ利用できる物理現象が存在する。生体分子機械の特長としてよく知られているのが、水素結合やファンデルワールス力を利用した「自己集合」の性質である。部品を集めておくだけで、それらが設計図どおりに組み合わせられ、機能を発揮できる機械に構築されるという、人工の機械では夢のような技術である。生体高分子（タンパク質や核酸、糖など）はそれぞれが独自の立体構造と水素結合を形成できる部位を持ち、それにうまく対応するような別の生体高分子と出会うと、ほかのものよりも強い結合を生じる。このような選択性のある結合が「自己集合」には不可欠である。

「自己集合」で忘れてはいけないのは、それぞれの生体高分子が熱運動をおこなっているということである。熱運動の大きさは個々の水素結合を切断するのに十分な

で、生体高分子どうしが安定な結合を保つためには決まった数以上の水素結合を持っていなければならない。もしこの条件が満たされないならば、すぐにこれらの結合は熱運動によって切断され離れていってしまうだろう。「自己集合」にはまちがった結合が生じたとしてもすぐに訂正できるという性質が含まれているのである。また、まだ結合していない生体高分子も熱運動をしているので、これらはひっきりなしにさまざまな分子と衝突を繰り返している。特別な装置を必要とせずに、この部品とあの部品を組み合わせるといった試行が成功するまで続けられる。

「自己集合」は、結合の選択性を決める分子の大きさと結合エネルギーの大きさ、熱運動のエネルギーの大きさなどの絶妙なバランスの上に成り立っている。タンパク質のような生体高分子の大きさでしか実現できない技術なのである。

分子どうしの選択的結合と熱運動を、生物は情報伝達にも巧みに利用している。たとえば、第6章で説明した細菌の走化性システムでは、細胞質内の分子の選択的なリン酸化と拡散によって情報が伝達される。細胞膜上にある何千という化学受容体からの情報を統合し、最終的に数個のべん毛モーターに回転方向の指令という形で情報が伝えられるシステムである。細菌の細胞質というたいへん小さな空間にこれだけの機能が押し込まれているというだけでなく、同じ空間にほかにもさまざまな情報が行き交う中で正常な動作をおこなっているということは驚異的である。同一の空間に情報を媒介する物が多数存在できることが、この特長を可能にしている。IC技術を中心にしたエレクトロニクス技術では、情報を媒介する電子を空間的・時間的に分離することによって複数の情報を扱えるようにしており、生物のシステムとは対照的である。

生体高分子間の選択的な結合にも現れているように、この微小な世界ではきわめて近距離でしか働かない相互作用（例えば、水素結合やファンデルワールス力など）を利用できるという特長を持っている。酵素の選択的な化学反応の促進は基質との選択的な結合によって実現されているが、これはまさに近距離相互作用によるものである。また、べん毛モーターや筋肉など、生体モータータンパク質がどのような原理によって力を発生しているのか未解明であるが、このような近距離相互作用をうまく利用していることが想像される。ほかにもさまざまな機能を果たす生体分子機械があるが、基本的には近距離相互作用を利用しているものがほとんどであろう。化学反応は水素結合の位置や立体構造を微妙に変化させるのに便利であることから、近距離相互作用との相性が高い。つまり、近距離相互作用が微小世界向きであるならば、化学反応自身も微小世界に向けたエネルギー変換形態であると言える。

7.2.2 大きいことの有利さ

第2章では、細菌は運動を続けるために、常にエネルギーを消費し続けていると述べた。力を出すのを止めた瞬間に ($0.1\mu\text{s}$ 以内に) 細菌の遊泳も止まってしまうのである。人間の世界では、力を出すのを止めてもしばらく動き続けること (慣性があること) が常識となっている。例えば、平らな場所で自転車を走らせているときには実際に力を出している時間はたいへん短いので、私たちはあまり疲れずに速く遠くまで移動できる。私たち人間は、移動に関して、細菌よりもずっと楽をしているのである。つまり、移動に関して言えば、大きいほどエネルギー効率がよいということになる。

生体分子機械は熱運動をうまく利用しているが、逆に言えば、熱運動は無視できない影響を持っているとも考えられる。ランダムな熱運動は雑音の原因であり、信号の質を悪化させる。さらに、統計的なゆらぎが無視できるほど関連している分子の数が多いという事実もある。熱運動と統計的ゆらぎの影響を小さくするためには大きくしさえすればよいのだが、生体分子機械の集合体である細菌菌体でさえ、ブラウン運動が観察できるほどで、熱運動 (またはゆらぎ) を無視するには無理がある。そろそろ量子効果を考慮しなければならないと言われている L S I の世界でも、ひとつひとつの機能素子の大きさは $1\mu\text{m}$ 程度で、細菌菌体程度である。大きくすればするほど S N 比のよい正確に動作する機械を製造できることは間違いがない。実際、細菌の走化性運動はランダムウォークだが、少なくとも人間は好物を見つけたらまっすぐそちらの方向へ向かうことができる。

7.2.3 その間を結ぶ技術

細菌など単細胞の小さな生物とは違って、人間などの大形の生物は、従来から生物が手に入っていた小さいことの有利さを生かす術を保持しながら、大きいことの有利

さを生かすためにさまざまな工夫をおこなってきたようだ。生物における物質の生産、エネルギーの蓄積、情報の伝達・変換の基本的な部分はすべて化学反応によって担われている。このやり方は微小な世界に適合しているが、必ずしもマクロな世界には合っているとは限らない。そこにはどうしても何らかの工夫が必要である。

それがもっとも顕著に現れているのが、生物が使っている移動するためのアクチュエーターの構成である。細菌はべん毛を回転させるべん毛モーターを利用している。あるものはひとつだけしか持っていないが、別のものは複数のべん毛を持っている。大形の細菌であるスピロヘーターは、べん毛束を細胞の内膜と外膜の間の空間に入れ、らせん形の菌体自身を回転させることによって移動する。しかし、いずれにしてもべん毛自身には力を発生する能力はなく、その根元のべん毛モーターが駆動源となっている。ところが、さらに大きな原生動物類（ゾウリムシや鞭毛虫など）になると、鞭毛や繊毛そのものが力を発生できるように、内部に微小管を中心にした構造が形成されている。活発に運動するさらに大きな生物になると、筋肉を使う場合が多くなる。もちろん人間も含まれる。生物体の大きさとともにアクチュエーターの構成はこのように変化しているのであるが、おもしろいことにべん毛モーターがもっとも機能的には複雑である。つまり、力の発生方向を変えることができるのである。しかし、生物体が大きくなった場合に必要なのはより大きな力の発生であるので、べん毛モーターが細菌以外の生物に採用されなかった。なぜなら、個々の生体分子機械の発生する力では大きな生物体を動かすにはまったく不十分なので、最も重要なことは生体分子機械を多数並べて力を統合できる構成を作ることだったのである。これが微小世界で成功した技術をマクロな世界に展開するための工夫である。筋肉の階層的に構築された美しいシステム構成（図46）は、生物の最高傑作のひとつであろう。

生物体が大きくなった場合に改良が必要なのはアクチュエーターに限ったことではない。アクチュエーターに指令を伝達する情報伝達・変換系もそれに対応したシステムにならないといけない。細菌の走化性システムの空間的な情報伝達は、情報伝達物質の拡散によっておこなわれている。しかし、これは完全に微小世界だからこそ利用できる方法である。つまり、物質の拡散は時間の平方根に比例するので、細菌の大きさ $1\mu\text{m}$ を 1ms で情報が伝達されたとしても、人間の大きさ 1m なら 10^9s （約30年！）という、とてつもない時間がかかってしまうのである。そこで大形の生物は神経を発達させた。神経は大きな繊維状の細胞で、細胞体で情報を統合し、電気信号によって情報を末端に伝達することによって、情報伝達にかかる時間を劇的に短縮している。また、情報を媒

介する物が統一されたおかげでさまざまな情報の関連づけが容易になり、巨大な脳（神経の巨大システム）を持つ人間にとって、ある刺激からさまざまな連想をするのは当然のこととなった。しかしながら、前述した細菌の走化性システムのような、情報ごとに媒介する物質が割り当てられているシステムの長所は、残念ながら同時に保持することはできない。そこで、大形の生物は、情報を伝達しなければいけない範囲と速度に応じて、いくつかの情報伝達の手段を使い分けているのである。

7.3 まとめ

私たちは人間の大きさの物理現象にはよくなじんでいるので、それを十分に利用する術もかなり身につけている。しかし、それだけではすまない分野にも進出していかなければならない場面が次第に増えつつある。そのひとつが微小世界で、マイクロエレクトロニクスからより大きな拡がりを持つマイクロエンジニアリング（微小世界の工学）に発展してきている。そこで必要となるのが、マイクロ理工学である。まず微小世界の物理現象をきちんと理解し、体系化していかなければならないが、このとき生物に多くのことを学ぶことができそうである。生物に学ぶ利点は、原理・法則だけではなくその応用の仕方まで見本を示してくれることである。さらに、マイクロとマクロを結ぶ技術も生物はすでに開発済みで、私たちに提示してくれている。生物は私たちが進む道をすでに先に歩んでおり、道しるべも残しておいてくれているように見える。

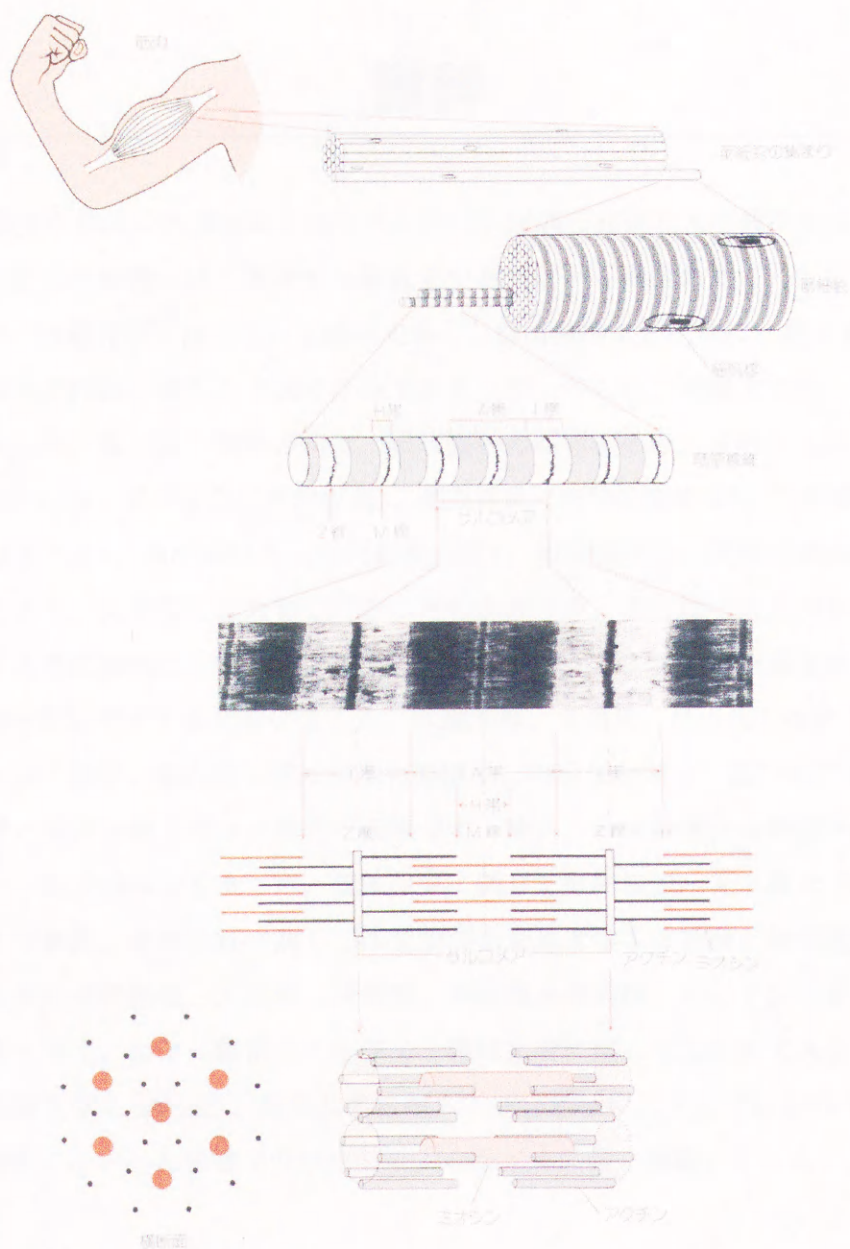


図46 筋肉の階層的構造。
丸山(1990)より転載。

謝辞

本論文の作成には長時間かかりましたが、江刺正喜東北大学教授をはじめ矢野雅文教授、佐藤正明教授にはご指導から審査まであたたかく面倒を見ていただきました。安川電機つくば研究所において、工藤成史博士、杉山滋博士とは常に一緒に研究を進め、有意義な日常の討論と研究の方向付けができました。さらに、本論文を読んで批評していただきました。私が安川電機の中で、細菌運動の研究を始め、さらにこれまで続けることができたのは、高津章氏（当時専務）、前波武氏（当時研究所長）、三浦博孝顧問（当時つくば研究所長）、御厨美和氏（当時研究室長）、池田満昭氏（現研究室長）が機会を与えてくださり、大きなご助力をくださったおかげです。宝谷紘一名古屋大学教授、相沢慎一帝京大学助教授は、宝谷超分子柔構造プロジェクトにおいて細菌運動の研究をおこなう機会を私に与えてくださいました。本論文は、工藤氏、杉山氏、相沢氏のほかに、山口滋明治大学教授、名古屋大学の村本和優博士、川岸郁朗博士、前川幸代氏、（故）今栄康夫教授と共同でおこなった研究の成果です。特に、今栄教授には研究上のあらゆる面でたいへんお世話になりました。流体力学に関しては柘植俊一元筑波大学教授、河内啓二東京大学教授、水の性質に関しては荒田洋治東京大学名誉教授、細菌運動に関しては名古屋大学の今栄教授、大沢研二助教授、本間道夫助教授、そして松下電器国際研究所の難波啓一博士、山下一郎博士、生体分子機械全般に関しては大沢文夫名古屋大学名誉教授（大阪大学名誉教授）、朝倉昌名古屋大学名誉教授に、それぞれお話をうかがい、その深い洞察にたいへん影響を受けました。みなさまに深く感謝いたします。

引用文献

以下に、各章で引用した文献のリストを記す。

第1章の引用文献

Azuma, A. (1992) "The biokinetics of flying and swimming." Springer-Verlag. Tokyo.

Glasheen J. W., and T. A. McMahon. (1996). "A hydrodynamic model of locomotion in the Basisk Lizard." *Nature*. 380:340-342.

河内啓二 (1995) 「生物の飛び方」パリティ、10:32-35

大貫武、河内啓二 (1995) 「昆虫に学ぶマイクロメカニックス」応用物理、64:822-825

林輝 (1988) 「微小走行機械」精密工学会誌、54:1646-1650

第2章の引用文献

Blair, D. F., and H. C. Berg. (1990) "The MotA protein of *E. coli* is a proton-conducting component of the flagellar motor." *Cell*. 60:439-449.

Francis, N. R., G. E. Sosinsky, D. Thomas, and D. J. DeRosier. (1994) "Isolation, characterization, and structure of bacterial flagellar motors containing the switch complex." *J. Mol. Biol.* 235:1261-1270.

Hirota, N., and Y. Imae. (1983) "Na⁺-driven flagellar motors of an alkalophilic *Bacillus* strain YN-1." *J. Biol. Chem.* 258:10577-10581.

- Jones, Christopher, J. and Shin-Ichi Aizawa (1991) "The bacterial flagellum and flagellar motor: Structure, assembly and function." *Advances in Microbial Physiology*, 32:109-172.
- Krieg, N. R., ed. (1984) "Bergey's manual of systematic bacteriology: Volume 1." Williams & Wilkins.
- Macnab, R. M. (1987) "Motility and chemotaxis." in "Escherichia coli and Salmonella typhimurium: Cellular and molecular biology." (F. C. Neidhardt, J. L. Ingraham, K. B. Low, B. Magasanik, M. Schaechter, and H. E. Umbarger, eds.) American Society for Microbiology.
- Manson, M. D., P. M. Tedesco, and H. C. Berg. (1977) "A protonmotive force drives bacterial flagella." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 74:3060-3064.
- Matsuura, S., J. Shioi, and Y. Imae. (1977) "Motility in *Bacillus subtilis* driven by an artificial protonmotive force." *FEBS Lett.* 82:187-190.
- Oosawa, K., T. Ueno, and S.-I. Aizawa. (1994) "Overproduction of the bacterial flagellar switch proteins and their interactions with the MS ring complex *in vitro*." *J. Bacteriol.* 176:3683-3691.
- Yamaguchi, S., S.-I. Aizawa, M. Kihara, M. Isomura, C. J. Jones, and R. M. Macnab. (1986b) "Genetic evidence for a switching and energy-transducing complex in the flagellar motor of *Salmonella typhimurium*." *J. Bacteriol.* 168:1172-1179.
- 今栄康雄 (1990) 「4. バクテリアの運動と行動」 in 香川靖雄編「岩波講座——分子生物科学7: エネルギーの生産と運動」岩波書店
- 巽友正 (1982) 「新物理学シリーズ21——流体力学——」培風館
- 米沢富美子 (1986) 「物理学 One Point 27——ブラウン運動——」共立出版

第3章の引用文献

- Berg, H. C. (1974) "Dynamic properties of bacterial flagellar motors." *Nature*. 249:77-79.

- Kami-ike, N., S. Kudo, and H. Hotani. (1991) "Rapid changes in flagellar rotation induced by external electric pulses." *Biophys. J.* 60:1350-1355.
- Lowe, G., M. Meister, and H. C. Berg. (1987) "Rapid rotation of flagellar bundles in swimming bacteria." *Nature*. 325:637-640.
- Manson, M. D., P. M. Tedesco, and H. C. Berg. (1980) "Energetics of flagellar rotation in bacteria." *J. Mol. Biol.* 138:541-561.
- Muramoto, K., I. Kawagishi, S. Kudo, Y. Magariyama, Y. Imae, and M. Homma. (1995) "High-speed rotation and speed stability of the sodium-driven flagellar motor in *Vibrio alginolyticus*." *J. Mol. Biol.* 251:50-58.
- Muramoto, K., Y. Magariyama, M. Homma, I. Kawagishi, S. Sugiyama, Y. Imae, and S. Kudo. (1996) "Rotational fluctuation of the sodium-driven flagellar motor of *Vibrio alginolyticus* by binding of inhibitors." *J. Mol. Biol.* 259:687-695.
- Shimada, K., T. Ikkai, T. Yoshida, and S. Asakura. (1976) "Cinemicrographic analysis of the movement of flagellated bacteria. II. The ratio of the propulsive velocity to the frequency of the wave propagation along flagellar tail." *J. Mechanochem. Cell Motility*. 3:185-193.
- Silverman, M., and M. Simon. (1974) "Flagellar rotation and mechanism of bacterial motility." *Nature*. 249:73-74.

第4章の引用文献

- Azuma, A. (1992) "The biokinetics of flying and swimming." Springer-Verlag. Tokyo.
- Berg, H. C., and L. Turner. (1993) "Torque generated by the flagellar motor of *Escherichia coli*." *Biophys. J.* 65:2201-2216.
- Chwang, A. T., and T. Y. Wu. (1971) "A note on the helical movement of micro-organisms." *Proc. R. Soc. Lond. B.* 178:327-346.
- Happel, J., and H. Brenner. (1973) "Low Reynolds number hydrodynamics." Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.

- Higdon, J. J. L. (1979) "The hydrodynamics of flagellar propulsion: helical waves." *J. Fluid Mech.* 94:331-351.
- Hirota, N., and Y. Imae. (1983) "Na⁺-driven flagellar motors of alkalophilic *Bacillus* strain YN-1." *J. Biol. Chem.* 258:10577-10581.
- Holwill, M. E. J., and R. E. Burge. (1963) "A hydrodynamic study of the motility of flagellated bacteria." *Arch. Biochem. Biophys.* 101:249-260.
- Iwazawa, J., Y. Imae, and S. Kobayashi. (1993) "Study of the torque of the bacterial flagellar motor using a rotating electric field." *Biophys. J.* 64:677-680.
- Kudo, S., Y. Magariyama, and S.-I. Aizawa. (1990) "Abrupt changes in flagellar rotation observed by laser dark-field microscopy." *Nature.* 346:677-680.
- Lowe, G., M. Meister, and H. C. Berg. (1987) "Rapid rotation of flagellar bundles in swimming bacteria." *Nature.* 325:637-640.
- Manson, M. D., P. M. Tedesco, and H. C. Berg. (1980) "Energetics of flagellar rotation in bacteria." *J. Mol. Biol.* 138:541-561.
- Meister, M., and H. C. Berg. (1987) "The stall torque of the bacterial flagellar motor." *Biophys. J.* 52:413-419.
- Ramia, M., D. L. Tullock, and N. Phan-Thien. (1993) "The role of hydrodynamic interaction in the locomotion of microorganisms." *Biophys. J.* 65:755-778.
- Shimada, K., T. Ikkai, T. Yoshida, and S. Asakura. (1976) "Cinemicrographic analysis of the movement of flagellated bacteria. II. The ratio of the propulsive velocity to the frequency of the wave propagation along flagellar tail." *J. Mechanochem. Cell Motility.* 3:185-193.
- Shinoda, S., and K. Okamoto. (1977) "Formation and function of *Vibrio parahaemolyticus* lateral flagella." *J. Bacteriol.* 129:1266-1271.
- Silverman, M., and M. Simon. (1974) "Flagellar rotation and mechanism of bacterial motility." *Nature.* 249:73-74.
- Washizu, M., Y. Kurahashi, H. Iochi, O. Kurosawa, S.-I. Aizawa, S. Kudo, Y. Magariyama, and H. Hotani. (1993) "Dielectrophoretic measurement of bacterial motor characteristics." *IEEE Trans. Ind. Appl.* 29:286-294.

Yoshida, S., S. Sugiyama, Y. Hojo, H. Tokuda, and Y. Imae. (1990) "Intracellular Na^+ kinetically interferes with the rotation of the Na^+ -driven flagellar motors of *Vibrio alginolyticus*." *J. Biol. Chem.* 265:20346-20350.

第5章の引用文献

Berg, H. C., and D. A. Brown. (1972) "Chemotaxis in *Escherichia coli* analyzed by three-dimensional tracking." *Nature*. 239:500-504.

Berg, H. C., and L. Turner. (1979) "Movement of microorganisms in viscous environments." *Nature*. 278:349-351.

Fujikawa, H. (1956) "The force acting on two equal circular cylinders placed in a uniform stream at low values of Reynolds number." *J. Phys. Soc. Japan*. 11:558-569.

Holt, S. C. (1978) "Anatomy and chemistry of spirochetes." *Microbiol. Rev.* 42:114-160.

Kaise, G. E., and R. N. Doetsch. (1975) "Enhanced translational motion of *Leptospira* in viscous environments." *Nature*. 255:656-657.

Kawagishi, I., M. Imagawa, Y. Imae, L. McCarter, and M. Homma. (1996) "The sodium-driven polar flagellar motor of marine *Vibrio* as the mechanosensor that regulates lateral flagellar expression." *Mol. Microbiol.* In press.

Kuwabara, S. (1957) "The forces experienced by two circular cylinders in a uniform flow at small Reynolds numbers." *J. Phys. Soc. Japan*. 12:291-299.

Lowe, G., M. Meister, and H. C. Berg. (1987) "Rapid rotation of flagellar bundles in swimming bacteria." *Nature*. 325:637-640.

Macnab, R. M. (1976) "Examination of bacterial flagellation by dark-field microscopy." *J. Clin. Microbiol.* 4:258-265.

Macnab, R. M. (1977) "Bacterial flagella rotating in bundles: a study in helical geometry." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 74:221-225.

Macnab, R. M., and D. E. Koshland, Jr. (1972) "The gradient-sensing mechanism in bacterial chemotaxis." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 69:2509-2512.

- McCarter, L., M. Hilmen, and M. Silverman. (1988) "Flagellar dynamometer controls swarmer cell differentiation of *V. parahaemolyticus*." *Cell*. 54:345-351.
- Namba, K., I. Yamashita, and F. Vonderviszt. (1989) "Structure of the core and central channel of bacterial flagella." *Nature*. 342:648-654.
- Schneider, W. R., and R. N. Doetsch. (1974) "Effect of viscosity on bacterial motility." *J. Bacteriol.* 117:696-701.
- Shimada, K., T. Ikkai, T. Yoshida, and S. Asakura. (1976) "Cinemicrographic analysis of the movement of flagellated bacteria. II. The ratio of the propulsive velocity to the frequency of the wave propagation along flagellar tail." *J. Mechanochem. Cell Motility*. 3:185-193.
- Shinoda, S., and K. Okamoto. (1977) "Formation and function of *Vibrio parahaemolyticus* lateral flagella." *J. Bacteriol.* 129:1266-1271.
- Shoesmith, J. G. (1960) "The measurement of bacterial motility." *J. Gen. Microbiol.* 22:528-535.
- Taneda, S. (1957) "Experimental studies of the lift on two equal circular cylinders placed side by side in a uniform stream at low Reynolds numbers." *J. Phys. Soc. Japan*. 12:419-422.

第6章の引用文献

- Hedblom, M. L. and J. Adler. (1983) "Chemotactic response of *Escherichia coli* to chemically synthesized amino acids." *J. Bacteriol.* 155:1463-1466.
- Jones, Christopher, J. and Shin-Ichi Aizawa (1991) "The bacterial flagellum and flagellar motor: Structure, assembly and function." *Advances in Microbial Physiology*, 32:109-172.
- Oosawa, K., and Y. Imae. (1983) "Glycerol and ethylene glycole: members of a new class of repellents of *Escherichia coli* chemotaxis." *J. Bacteriol.* 155:104-112.
- Parkinson, J. S., S. R. Parker, P. B. Talbert, and S. E. Houts. (1983) "Interactions between chemotaxis genes and flagellar genes in *Escherichia coli*." *J. Bacteriol.* 155:265-274.
- Parkinson, J. S., and S. R. Parker. (1979) "Interaction of the *cheC* and *cheZ* gene products is required for chemotactic behavior in *Escherichia coli*." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 75:2390-2394.

- Stock, J. B., G. S. Lukat, and A. M. Stock. (1991) "Bacterial chemotaxis and the molecular logic of intracellular signal transduction networks." *Annu. Rev. Biophys. Chem.* 20:109-136.
- Wolfe, A. J., M. P. Conley, T. J. Kramer, and H. C. Berg. (1987) "Reconstitution of signaling in bacterial chemotaxis." *J. Bacteriol.* 169:1878-1885.
- Yamaguchi, S., H. Fujita, A. Ishihara, S.-I., Aizawa, and R. M. Macnab. (1986a) "Subdivision of flagellar genes of *Salmonella typhimurium* into regions responsible for assembly, rotation, and switching." *J. Bacteriol.* 166:187-193.
- Yamaguchi, S., H. Fujita, K. Sugata, T. Taira, and T. Iino. (1984) "Genetic analysis of H2, the structural gene for phase-2 flagellin in *Salmonella*." *J. Gen. Microbiol.* 130:255-265.
- Yamaguchi, S., S.-I. Aizawa, M. Kihara, M. Isomura, C. J. Jones, and R. M. Macnab. (1986b) "Genetic evidence for a switching and energy-transducing complex in the flagellar motor of *Salmonella typhimurium*." *J. Bacteriol.* 168:1172-1179.
- 今栄康雄 (1990) 「4. バクテリアの運動と行動」 in 香川靖雄編「岩波講座——分子生物科学 7 : エネルギーの生産と運動」岩波書店

第7章の引用文献

- 丸山工作 (1990) 「5. 筋肉」 in 香川靖雄編「岩波講座——分子生物科学 7 : エネルギーの生産と運動」岩波書店

発表リスト

主論文

本論文の内容の一部は、下記の論文としてすでに発表している。各論文の先頭の数字は、関係する章を示す。

4. Yukio Magariyama, Shigeru Sugiyama, Kazumasa Muramoto, Ikuro Kawagishi, Yasuo Imae, and Seishi Kudo. "Simultaneous measurement of bacterial flagellar rotation rate and swimming speed." *Biophysical Journal*. (1995) Vol.69. pp.2154-2162.
4. Yukio Magariyama, Shigeru Sugiyama, Kazumasa Muramoto, Yukiyo Maekawa, Ikuro Kawagishi, Yasuo Imae, and Seishi Kudo. "Very fast flagellar rotation." *Nature*. (1994) Vol.371. p.752.
6. Yukio Magariyama, Shigeru Yamaguchi, and Shin-Ichi Aizawa. "Genetic and behavioral analysis of flagellar switch mutants of *Salmonella typhimurium*." *Journal of Bacteriology*. (1990) Vol.172. pp.4359-4369.

なお、第5章の研究に関する論文（下記）は準備中である。

Yukio Magariyama, Shigeru Sugiyama, and Seishi Kudo. "Hydrodynamic behavior of bacterial flagella in a bundle." In preparation.

参考論文

1. Okino, H., M. Isomura, S. Yamaguchi, Y. Magariyama, S. Kudo, and S.-I. Aizawa. (1989) "Release of flagellar filament-hook-rod complex by a *Salmonella typhimurium* mutant defective in the M ring of the basal body." *J. Bacteriol.* 171:2075-2082.

2. Seishi Kudo, Yukio Magariyama, and Shin-Ichi Aizawa. (1990) "Abrupt changes in flagellar rotation observed by laser dark-field microscopy." *Nature*. 346:677-680.
3. Washizu, M., Y. Kurahashi, H. Iochi, O. Kurosawa, S.-I. Aizawa, S. Kudo, Y. Magariyama, and H. Hotani. (1993) "Dielectric measurement of bacterial motor characteristics." *IEEE Trans. Industry Applicat.* 29:286-294.
4. Muramoto, K., I. Kawagishi, S. Kudo, Y. Magariyama, Y. Imae, and M. Homma. (1995) "High-speed rotation and speed stability of the sodium-driven flagellar motor in *Vibrio alginolyticus*." *J. Mol. Biol.* 251:50-58.
5. Muramoto, K., Y. Magariyama, M. Homma, I. Kawagishi, S. Sugiyama, Y. Imae, and S. Kudo. (1996) "Rotational fluctuation of the sodium-driven flagellar motor of *Vibrio alginolyticus* by binding of inhibitors." *J. Mol. Biol.* 259:687-695.

解説

1. 相沢慎一、曲山幸生 (1989) 「第7章 イオンモータ」 in [生命科学の基礎6——生体膜の分子素子・分子機械——] (日本生物物理学会編) 学会出版センター pp.143-154.
2. 工藤成史、曲山幸生、相沢慎一 (1991) 「レーザー暗視野顕微鏡によるべん毛モータの回転計測」 生物物理 31:38-40.
3. 工藤成史、曲山幸生 (1993) 「細菌べん毛モータの回転計測」 材料科学 30:210-214.
4. 工藤成史、曲山幸生、杉山滋 (1994) 「分子機械・べん毛モータ」 機械の研究 46:210-213.
5. 工藤成史、曲山幸生、杉山滋 (1995) 「バクテリアの運動とべん毛モータ」 トライボロジスト 40:488-493.
6. 曲山幸生、工藤成史 (1995) 「細菌べん毛モータの機能測定」 メカライフ No.41, 38-39.

国際会議発表

1. Okino, H., Y. Magariyama, S. Kudo, S.-I. Aizawa, and S. Yamaguchi. (1988) "Analysis of a mutant (SJW3060) having a defect in the M-ring of the flagellar basal body." *Gordon Conference on 'Sensory transduction in microorganisms.'*
2. Okino, H., Y. Magariyama, S. Kudo, S.-I. Aizawa, M. Isomura and S. Yamaguchi. (1988) "Analysis of a mutant defective in the M-ring of the flagellar basal body." *Second Japan-China Bilateral Symposium on Biophysics.* 313.
3. Kudo, S., Y. Magariyama, and S.-I. Aizawa. (1990) "Abrupt changes in rotation speed of bacterial flagellar motor observed by laser dark-field microscopy." *Gordon Conference on 'Sensory transduction in microorganisms.'*
4. Yamaguchi, S., Y. Magariyama, and S.-I. Aizawa. (1990) "Switch complex mutants can tumble even in the absence of the sensory transduction system." *Gordon Conference on 'Sensory transduction in microorganisms.'*
5. Kami-ike, N., S. Kudo, Y. Magariyama, S.-I. Aizawa, and H. Hotani. (1991) "A rotary biomotor. Structure, characteristics and regulation." *Proc. Internal. Confer. IEEE Enginer. Med. Biol. Soc.* No.13, 1788-1789.
6. Hotani, H., N. Kami-ike, S. Kudo, Y. Magariyama, and S.-I. Aizawa. (1991) "Characteristics of an ultra-small biomotor." *Proc. of IEEE Micro Electro Mechanical Systems Work Shop.* 245-246.
7. Hotani, H., N. Kami-ike, S. Kudo, Y. Magariyama, T. Ueno ,and S.-I. Aizawa. (1992) "Structure and characteristics of an ultra-small biomotor." *Proc. 1st International Conference on Intelligent Materials.* 86.
8. Magariyama, Y., S. Sugiyama, Y. Maekawa, I. Kawagishi, Y. Imae, and S. Kudo. (1993) "Simultaneous measurement of flagellar rotation rate and swimming speed of bacteria." *Proc. 11th International Biophysics Congress.* 99.

国内学会発表

1. 工藤、曲山、相沢(1987.11)「バクテリアのべん毛モータの回転計測」日本生物物理学会、3 D 1 4 3 0
2. 沖野、曲山、相沢、磯村、山口(1987.11)「べん毛を脱落しやすい突然変異体のべん毛基部体の解析」日本生物物理学会、3 D 1 4 4 5
3. 曲山、相沢、山口(1988.10)「べん毛モータのスイッチの機能の解析」日本生物物理学会、1 H 1 1 0 0
4. 工藤、曲山、相沢(1988.10)「一個のべん毛モータの回転計測」日本生物物理学会、1 H 1 1 3 0
5. 曲山、大澤、工藤、相沢(1989.10)「べん毛モータの回転方向に及ぼすガラス表面の効果」日本生物物理学会、1 G 1 3 3 0
6. 工藤、曲山、相沢(1989.10)「べん毛モータの高速回転時の pausing」日本生物物理学会、1 G 1 3 4 5
7. 工藤、曲山、相沢、中山(1990.3)「極微小バイオモータの回転計測」応用物理学会、2 9 a H 6
8. 曲山、工藤、鷺津(1990.9)「高周波交流電場によるバクテリアべん毛モータの強制回転」精密工学会
9. 工藤、曲山、相沢、中山、難波(1990.9)「極微小バイオモータの回転計測 (II)」応用物理学会、2 7 a Z C 1 0
10. 曲山、工藤、大澤、相沢(1990.10)「ガラスの表面電位とテザードセルの回転方向」日本生物物理学会、3 G 1 1 0 0
11. 工藤、曲山(1990.10)「べん毛回転速度と負荷」日本生物物理学会、3 G 1 1 1 5
12. 工藤、曲山、相沢、上池、宝谷(1990.10)「バクテリアべん毛の回転計測」日本生物物理学会、3 B 1 3 3 0 (ビデオセッション)

13. 工藤、曲山、相沢(1991.9)「べん毛回転速度の過渡的变化」日本生物物理学会、1 D 1 7 1 5
14. 曲山、工藤、大澤、相沢、山口(1991.9)「ガラスの表面電位とテザードセルの回転方向Ⅱ」日本生物物理学会、1 D 1 6 4 5
15. 相沢、工藤、曲山、宝谷、鷺津、倉橋、黒澤、山口(1991.9)「回転電界を用いたべん毛モーターの特性の測定」日本生物物理学会、1 D 1 7 0 0
16. 工藤、曲山(1991.10)「べん毛モーター回転のオン・オフ過程の観察」応用物理学会、1 1 a S S 1 0
17. 曲山、工藤、相沢、宝谷、倉橋、鷺津(1991.10)「回転電場によるべん毛モータへの外部トルクの印加」精密工学会
18. 工藤、曲山(1992.9)「べん毛モーターの回転特性」応用物理学会
19. 村本、曲山、工藤、前川、川岸、今栄(1992.12)「Na⁺駆動型べん毛モーターの動作特性」日本機械学会第2回設計工学・システム部門講演会
20. 村本、工藤、曲山、前川、川岸、今栄(1992.10)「バクテリア鞭毛モーターの回転安定性に対する共役イオン流の影響」日本生化学会
21. 村本、前川、川岸、今栄、工藤、曲山(1992.12)「ナトリウム・イオン駆動型べん毛モーターのイオン共役機構」第18回生体エネルギー研究会
22. 曲山、村本、工藤、前川、川岸、今栄(1993.3)「Na⁺駆動型べん毛モータへの阻害剤の効果」日本物理学会
23. 曲山、前川、川岸、今栄、工藤(1993.3)「細菌の運動を流体力学で解析できるか」応用物理学会
24. 村本、工藤、曲山、前川、川岸、本間、今栄(1993.9)「Na⁺駆動型細菌鞭毛モーターにおける共役イオン流の影響」日本生物物理学会、2 D 1 0 4 5
25. 工藤、杉山、前川、川岸、今栄、曲山(1993.9)「細菌の遊泳速度とべん毛回転数の同時測定」日本生物物理学会、2 D 1 1 0 0
26. 曲山、杉山、工藤(1993.9)「細菌の遊泳速度とべん毛回転数の力学的解析」日本生物物理学会、2 D 1 1 1 5

27. 曲山、杉山、工藤(1994.9)「べん毛モーターの回転数と発生トルクの関係」日本生物物理学会、1 G 1 2 1 5
28. 工藤、曲山、杉山(1994.9)「同一菌体上の2本のべん毛の回転の相関」日本生物物理学会、1 G 1 2 3 0
29. 杉山、曲山、小山、工藤(1994.9)「通性嫌気性好アルカリ性菌 *A.xyloxydans* の Na^+ 駆動型べん毛モーター」日本生物物理学会、1 G 1 2 4 5
30. 鈴木、広津、曲山(1994.10)「高分子基板の疎水親水転移を利用した界面力形成と微小物体駆動法」高分子学会
31. 村本、工藤、曲山、川岸、本間(1994.9)「ビブリオ菌 Na^+ 駆動型モーターのトルク特性の解析：鞭毛回転速度に対する外液粘度の影響」日本生物物理学会、1 G 1 5 1 5
32. 工藤、曲山、杉山(1995.9)「同一菌体上の2本のべん毛回転の同時観測」日本生物物理学会、1 C 0 2
33. 杉山、曲山、工藤(1995.9)「アルカリ耐性グラム陰性菌べん毛モーターのイオン共役」日本生物物理学会、1 C 0 3
34. 曲山、杉山、工藤、菊池(1995.9)「細菌添加による血液レオロジー変化の測定」日本生物物理学会、2 S 1 - 1 4 4 0 (ビデオセッション)
35. Kikuchi, Y., Y. Magariyama, S. Sugiyama, and S. Kudo. (1995) "Leukocyte rheology in a model of bacteremia." *Microcirculation annual*. 日本微小循環学会、11:31-32.

